



TITLE:

新規リプログラミング制御因子 Foxd1の同定と機能解析(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

古賀, 牧土

CITATION:

古賀, 牧土. 新規リプログラミング制御因子Foxd1の同定と機能解析. 京都大学, 2014, 博士(生命科学)

ISSUE DATE:

2014-03-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k18420>

RIGHT:

新規リプログラミング制御因子 Foxd1 の 同定と機能解析

古賀 牧土

目次

要旨	・ ・ ・ ・ 2
序論	・ ・ ・ ・ 3
結果	・ ・ ・ ・ 6
考察	・ ・ ・ ・ 54
材料と方法	・ ・ ・ 56
引用文献	・ ・ ・ 63
謝辞	・ ・ ・ ・ 68

要旨

2006 年にマウス iPS 細胞の樹立が報告されて以来、リプログラミングに関して多くの研究がなされてきた。しかし、リプログラミングで何が起きているのか、すなわちリプログラミングのメカニズムについて明らかになったことは少ない。本研究では、コンピュータを用いた転写因子予測により、リプログラミングの新規制御因子の同定を目指した。私は、先ず MEF(マウス胚性線維芽細胞)から iPS 細胞へのリプログラミングにおける遺伝子発現変化の網羅的解析を行った。その結果を基にプロモーター解析を行い、リプログラミング過程で生じる遺伝子発現変化を引き起こす転写因子の予測を行った。予測された転写因子の発現抑制によるリプログラミング抑制効果を調べた結果、Foxo1 と Foxd1 がリプログラミングに寄与している転写因子であることがわかった。また、Foxd1 が Dax1 などの下流遺伝子の発現を制御しリプログラミングに寄与する可能性が示唆された。さらに、Foxd1 レポーター細胞を用いた解析から、Foxd1 の発現上昇は一部の限定された細胞にのみ起こることがわかった。この Foxd1 発現細胞は Foxd1 未発現細胞に比べてより多くの iPS 細胞を生み出したことから、Foxd1 はリプログラミングが進行した細胞特異的に発現することがわかった。興味深いことに、Foxd1 は iPS 細胞では発現しておらず、リプログラミング過程で一過的な発現を示すことがわかった。さらに、Cre-loxP システムを用いた Foxd1 発現細胞の運命追跡実験から、iPS 細胞コロニーの 95%以上がリプログラミング過程で Foxd1 を発現していたことがわかった。以上の結果より、新規リプログラミング制御因子である Foxd1 は、リプログラミングされる過程で発現が一過的に上昇する時期特異的のマーカであることがわかった。

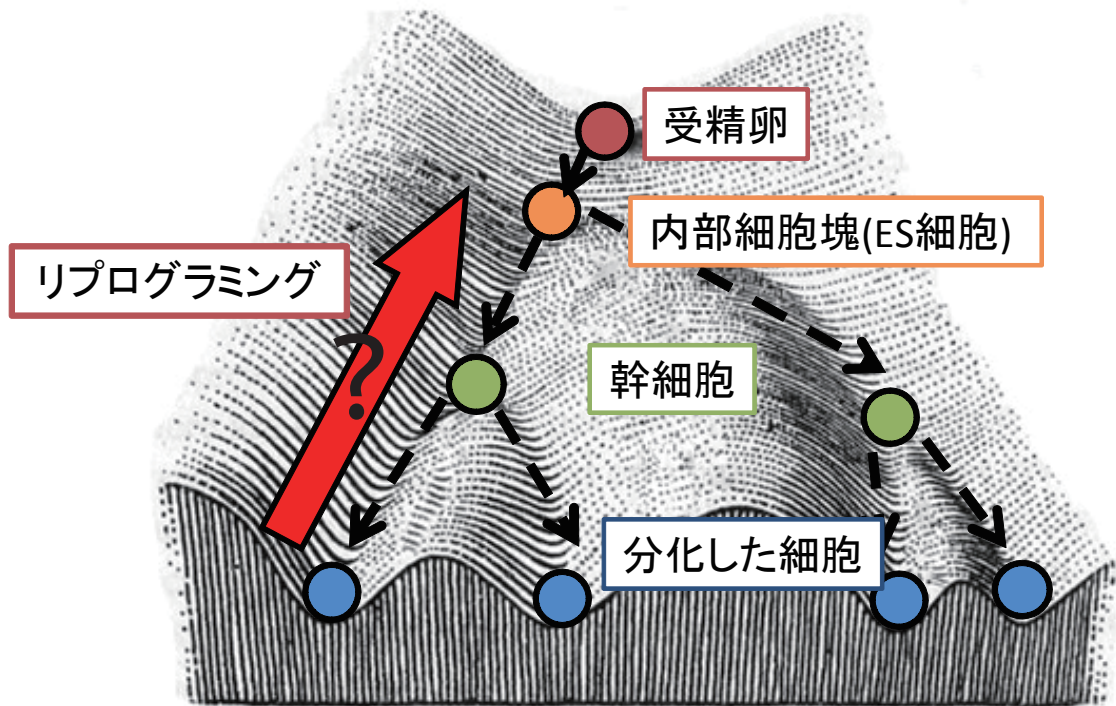
序論

発生により生じる細胞種の多様化は、ワディントン地形と呼ばれる坂道に例えられてきた。ワディントンはこの地形図を用いて、受精卵が運命決定の選択を経て様々な分化した細胞に至る様子を坂道を転がるボールに準えた(図 1)¹。この地形は、上位の細胞は様々な細胞種に分化する能力を持っているということ、そして下位の細胞は上位の細胞に戻ることはできないということを示している。しかし、2006 年に分化した体細胞に 4 つの転写因子(Oct4, Sox2, Klf4, cMyc)を発現させることにより、ES 細胞(Embryonic stem cells)様の多能性を持った細胞である iPS 細胞(induced pluripotent stem cells)が樹立できることが報告された²。すなわち、下位の細胞が上位の細胞に戻るができるということが示されたのである。この報告を契機として、ある細胞から別の細胞を作り出し医療・創薬に役立てようとする研究が盛んに行われるようになった。iPS 細胞は、ES 細胞を用いた再生医療における 2 つの問題(倫理的問題・移植における拒絶反応の問題)を解決するものである。結果として、再生医療の実現可能性を高め、治療を期待する人々を中心に大きな注目を集めている³。

これまでに様々な細胞由来の iPS 細胞が樹立され、またリプログラミングで起こる現象について多くの報告がなされてきた^{2,4-11}。現在、iPS 細胞を中心とするリプログラミングの研究は、大きく 3 つに分けられる。1 つめに、iPS 細胞を目的の細胞に分化させる研究である。病気の原因が何かしらの細胞機能の不全状態であるとき、その原因となる細胞機能を回復させることが治療につながるとされる¹²。例えば、糖尿病の原因が膵臓 β 細胞の機能不全であるなら、正常な β 細胞を体内に移植すれば血糖値の改善が期待できる。このような治療を目指した iPS 細胞研究が、多くの研究者によってなされている。また、病気の患者さん由来の iPS 細胞を樹立しその原因を探る研究や、がん化しにくい性質や分化しやすい性質を持つ「質のいい」iPS 細胞を探る研究も行われている¹³⁻¹⁸。2 つめに、体細胞から iPS 細胞を介さずに別の細胞へと変換させるダイレクトリプログラミングの研究が挙げられる。これまでに MEF(mouse embryonic fibroblasts: マウス胚性線維芽細胞、以降 MEF とする)から iPS 細胞を介さずに神経細胞や心筋細胞など、様々な細胞種へのダイレクトリプログラミングが報告されている¹⁹⁻²²。そして 3 つ目に、リプログラミングのメカニズムに関する研究である。分化した体細胞と iPS 細胞では、遺伝子発現プロファイル、DNA のメチル化状態やヒストン修飾などのエピジェネティックな修飾を含め多くの面で性質が異なる^{2,5-11,23,24}。そのドラスティックな変化を引き起こすメカニズム、すなわちリプログラミング誘導因子導入以降の反応に関しては、解

明されていない部分が大きい。現在までに様々な工夫を凝らした解析がなされ、リプログラミングは細胞増殖の亢進、細胞形態の変化、MET(mesenchymal to epithelial cell transition)や未知の確率的なステップを含む多段階の反応であると考えられている^{7,8,25}。

本研究では、マイクロアレイ解析によって得られた結果を基に、リプログラミング過程で発現が上昇した転写因子のプロモーター領域にどんな転写因子結合サイトが多く存在するかという観点で、リプログラミングに寄与する転写因子を予測した。続いて、予測された転写因子の発現抑制が与えるリプログラミングへの影響を調べ、リプログラミングの新規制御因子として Foxo1 と Foxd1 の2つのフォークヘッド型転写因子を同定した。さらに Foxd1 レポーター細胞を用いた実験から、Foxd1 の発現がリプログラミング過程特異的に一過的に上昇することが明らかになり、また Foxd1 がその下流遺伝子の発現を制御することでリプログラミングに影響を与えている可能性が示唆された。また、Cre-loxP システムを用いた Foxd1 発現細胞の運命追跡実験により、iPS 細胞コロニーの95パーセント以上がリプログラミング過程で Foxd1 の発現上昇を経験していることがわかった。すなわち、Foxd1 はリプログラミングの新規制御因子であり、またリプログラミングが「進んでいる」ことを示す時期特異的なマーカーであることがわかった。



Waddington's landscape

Waddington 1957 を改変

図1 ワディントン地形とリプログラミング

受精卵は、個体を形成することができる全能性を持った細胞である。胚盤胞の内部細胞塊より作られたES細胞は多能性を有し、理論上すべての組織に分化することができる。幹細胞（神経幹細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞など）は、定められた細胞系列への分化が可能な細胞であり、分化した細胞を生み出す。発生における細胞腫の多様化は、下に行くほど溝の数の増える坂道（ワディントン地形）にたとえられてきた。分化ポテンシャルの高い細胞は様々な細胞種に分化する能力を持っている一方、分化ポテンシャルの低い細胞はより上位の細胞に戻ることができないと考えられてきた。しかし、2006年のiPS細胞の樹立により、終末分化した細胞がリプログラミングされ、より分化ポテンシャルの高い細胞に戻るということが示された。しかし、リプログラミングのメカニズム、効率の低さの原因、リプログラミングされる細胞とリプログラミングされない細胞の違いなど、リプログラミング過程には様々な謎が残されている。

結果

マイクロアレイ解析によりリプログラミング過程で発現が上昇する遺伝子を 813 個見出した

本研究では、MEF から iPS 細胞に至るリプログラミング過程において、4 因子(Oct4, Sox2, Klf4, cMyc)の発現以後にリプログラミングに関与する転写因子の同定を目指した。私は、新規リプログラミング制御因子同定のためにプロモーター解析を行うことを考えた。プロモーター解析はこれまでに様々な分化誘導系においてカギとなる転写因子を同定している²⁶⁻²⁹。マイクロアレイ解析によりリプログラミング過程で起こる遺伝子発現変化を検出し、その結果をもとにプロモーター解析を行うことによって、リプログラミングに重要な働きを持つ転写因子が見出せると考えた。

まず、マイクロアレイ解析に先立ちその条件検討を行った。リプログラミングは様々な細胞種から様々な誘導法(レトロウィルス、レンチウィルス、プラスミドなど)により行われており、手法によりその効率や誘導にかかる時間が異なる³⁰⁻³³。私は、MEF にレトロウィルスによって 4 因子を発現させるリプログラミングの誘導系において実験を行うことに決めた。この方法は 2006 年に報告されたものであり、その後も多くの研究者により用いられている方法である²。私はこのリプログラミング誘導系において、iPS 細胞コロニーの形成時期、ウィルス由来の遺伝子のサイレンシング、多能性マーカー遺伝子の発現上昇により、マイクロアレイ解析を行うタイムコースの検討を行った。顕微鏡を用いた解析から、4 因子誘導後 Day 5 頃よりコロニーが形成され(図 2A)、Day 6-8 頃よりウィルス由来の遺伝子のサイレンシングが起り、多能性マーカーである Nanog の発現が上昇した(図 2B)。また、qRT-PCR 解析により Nanog と Oct4 の 2 種類の多能性マーカーの発現を調べたところ、ともに発現は Day 5 頃より上昇を開始し Day 8-10 頃に最も高い発現レベルに至り、以降やや減少するものの高い発現レベルを維持し続けることが分かった(図 2C)。MEF からのリプログラミング効率は数パーセントとされている^{2,34}。そうした条件での中で、このように多能性マーカーの発現上昇が細胞集団レベルの解析で検出できることは驚きであったが、iPS 細胞は非常に増殖の速い細胞でありディッシュの中でその割合が時間の経過とともに高まるということ、また MEF と iPS 細胞における多能性マーカーの発現量の差が非常に大きいということもあり、細胞集団レベルの解析であってもリプログラミング特異的なシグナルが充分に検出できるものと考えられる^{34,35}。なお、本研究では MEF に対して human 由来の 4 因子を誘導しており、qRT-PCR 解析ではその配列の違いからウィルス由来の 4 因子(human 由来の 4 因子)

と内在性の4因子(mouse由来の4因子)を区別して検出することができる(図2D)。私は、これらの解析の結果より iPS 細胞が出現する Day 8 までの時期に注目し、MEF(Day 0)と4因子感染群7時点(Day 1、Day 2、Day 3、Day 4、Day 5、Day 6、Day 8)、コントロールとして GFP 感染群4時点(GFP Day 1、GFP Day 3、GFP Day 5、GFP Day 8)の計12時点をタイムポイントとして定めマイクロアレイ解析を行うことを決めた(図3A)。

本研究で行ったマイクロアレイ Mousegene 1.0 ST アレイは、28856 のプローブセットについてその発現量を調べることができる。図3Aに示す計12時点で行ったマイクロアレイ解析の結果、Day 0 に対して発現が2倍以上に上昇する813のプローブセットを見出した(図3B・表1)。この中には、多くの転写因子、クロマチン制御因子、リン酸化酵素といった細胞運命決定に重要な役割を持つ遺伝子が含まれていた。また、この結果を基にクラスタリング解析を行った。その結果、4因子感染群(Day 2以降)と GFP 感染群(Day 3以降)では、遺伝子発現プロファイルが大きく異なっていた(図3C)。また、同じ4因子感染群の中でも Day 6-8 は Day 2-5 とは比較的に異なった遺伝子発現プロファイルを持つことが分かった(図3C)。この結果は、Day 5-6 の時期に遺伝子発現が大きく変化するということを意味する。これは、Sox2、Nanog、Oct4 ら多能性マーカーの発現上昇のタイミング(図2C・図3D)や、コロニー形成のタイミングに一致する(図2A)。

新規のリプログラミング制御因子として2つのフォークヘッド型転写因子(Foxd1 と Foxo1)を予測した

次に、マイクロアレイの結果を基にプロモーター解析を行った。発現が2倍以上に上昇していた遺伝子について、転写開始点付近の配列のデータベースである DBTSS より転写開始点上流1200塩基対の情報を得て、TRANSFAC の578のマトリクス(すなわち転写因子結合配列)が存在するかを調べた(図4A)³⁶⁻³⁸。発現が上昇した813プローブセット(表1)のうち、Day 8 の時点で発現が上昇しかつ転写開始点上流のプロモーター領域の配列情報が存在していた遺伝子が411個あった。この411遺伝子に注目しプロモーター解析を行った結果、FREAC4(別名 Foxd1、以降 Foxd1 とする)、Foxo1 や VDR などマトリクスが統計学的に優位に存在することがわかった(図4B)。なお、1つのタイムポイントや複数のタイムポイントをまとめたグループなど様々なグループ分けを基にプロモーター解析を行ったが、Day 8 における Foxd1 が最も低い p-value(2.86×10^{-7})を示した(図4B)。このとき、Oct4、Nanog、Sox2 といった多能性の維持に必要な転写因子の p-value は有意に低い値ではなかった(図4B)。本研究では、これらの転写因子の予測を受け、Foxd1 と Foxo1 の2つのフォークヘッド型転写因子に注目した。

Foxd1 は、腎臓の発生、網膜の発生、精子の発生に関与すること報告されているが、これまでにリプログラミングに関わるという報告はない³⁹⁻⁴⁵。腎臓は大きく分けて4つの組織(間葉、尿管芽、血管、間質)からなるが、Foxd1 は間質に発現することが知られている^{44,45}。また、Foxo1 は寿命やストレス応答など様々なシグナル応答に関与することが知られている⁴⁶⁻⁴⁹。Foxo1 の発現がES細胞の多能性の維持に必要であるという報告がある一方、Foxo1 のドミナントネガティブがリプログラミングを促進するという報告もあり、リプログラミングにおけるFoxo1 の働きについては未解明な部分がある^{48,49}。

これら2つのフォークヘッド型転写因子は、それ自身の発現量がリプログラミング誘導時に上昇していた(図4C)。より正確な発現量の変化を知るために行ったqRT-PCR解析では、リプログラミング過程でその発現が上昇すること、Day 6-8頃をピークとしその後時間の経過と共に発現が減少すること、また発現上昇のタイミングが多能性マーカーであるOct4に比べて早いことが分かった(図4D)。ただし、qRT-PCR解析はあくまでも細胞集団レベルの解析であり、リプログラミングされる細胞特異的な発現上昇のタイミングを知るためにはシングルセルレベルの解析が必要である。

4 因子によるリプログラミングと3 因子によるリプログラミングの違い

これまでの解析は4因子発現によるリプログラミングの誘導を行っているが、MEFからのリプログラミングの場合、3因子(4因子からcMycを除いたOct4、Sox2、Klf4の3つの転写因子)の発現条件でもリプログラミングを誘導することができる^{50,51}。本研究においても、3因子発現でも4因子発現と同じく多能性マーカーであるNanogの発現が上昇し、iPS細胞コロニーが出現することが確かめられた(図5A)。なお3因子の場合、4因子に比べて発現上昇始めるタイミング、発現ピークに達する時期が遅くなり、また発現ピーク値はより大きな値となった(図5A)。これはcMycの有無により細胞の増殖速度が変化しiPS細胞出現までの時間が変化すること、リプログラミングされなかった細胞の影響の程度が変化することに因るものと考えられる^{50,51}。また、Foxd1とFoxo1の発現は、3因子においても4因子と同じく発現が上昇した(図5B)。またこの時、樹立されたiPS細胞とES細胞におけるFoxd1とFoxo1の発現量も同時に調べところ、Foxd1、Foxo1ともにiPS細胞とES細胞における発現量はMEF(Day 0)と同程度と低い発現レベルをとることが分かった。

これらの結果より、リプログラミング誘導時、3因子もしくは4因子に制御される形でFoxd1やFoxo1の発現が上昇し、下流遺伝子の発現を制御することでリプログラミ

ングに寄与しているのではないかと考えた。

なお、3 因子によるリプログラミングは 4 因子に比べてより大きなシグナル値を得ることができることから、以降のリプログラミング誘導実験は Oct4、Sox2、Klf4 の 3 因子の発現により行った。

Foxo1 と Foxd1 の発現抑制はリプログラミング効率を減少させる

次に、この 2 つのフォークヘッド型転写因子の発現抑制によるリプログラミングへの影響を調べた。Foxo1 と Foxd1 に対してそれぞれターゲット配列の異なる 2 種類の shRNA を作製し、H1 プロモーターとともにレンチウイルスベクターに挿入した。本研究では、2 週間以上の長期間にわたって発現抑制を行う必要があることから、レンチウイルスによる shRNA の発現を行った。Nanog-GFP-IRES-PuroR マウス由来の MEF(以下 Nanog レポーターMEF)に shRNA レンチウイルスを感染させ、その後 3 因子レトロウィルスの感染を行いリプログラミング誘導を行った。Nanog レポーターMEF は、Nanog プロモーター制御下で蛍光タンパク質である GFP と puromycin 耐性タンパク質を発現する⁴。まず、qRT-PCR 解析により shRNA によって Foxo1 と Foxd1 の発現量が低下していることを確認した(図 6A)。そして、この発現抑制におけるリプログラミング効率の変化を調べた。リプログラミング効率の評価は、puromycin による薬剤選択後の iPS 細胞コロニー数の計測、FACS 解析による GFP 陽性(すなわち Nanog 陽性)細胞割合の計測、qRT-PCR 解析による Nanog の発現レベルにより行った(図 6B-D)。いずれの方法においても Foxo1 と Foxd1 の発現抑制によりリプログラミング効率の減少が認められた。すなわち、Foxo1 と Foxd1 はそれぞれリプログラミングにポジティブに寄与していることがわかった。なお、リプログラミングを評価した 3 つの方法のうち FACS 解析と qRT-PCR 解析は、細胞数に応じてシグナル値が補正される解析法である。FACS 解析は総細胞数における Nanog 陽性細胞の割合を求め、qRT-PCR 解析はハウスキーピング遺伝子である Gapdh による補正を行っている。

Foxd1 はリプログラミングにポジティブに寄与するが、必須ではない

Foxd1 の shRNA は Foxd1 の発現レベルを減少させることができたものの、Day 8 頃に見られる発現上昇を抑えることはできなかった(図 6A)。また Foxd1 の発現抑制によるリプログラミング効率の抑制は Foxo1 に比べて小さかったこと(図 6B-D)から、Foxd1 のノックアウト細胞を用いればリプログラミング効率をさらに減少させることができ

るのではないかと考えた。そこで、Foxd1 が EGFP-Cre に置換されたゲノムを持つマウス(すなわち Foxd1 のプロモーターの制御下で Foxd1 の代わりに EGFP-Cre の融合タンパク質を発現する)を用いてリプログラミング実験を行った⁴⁰。この Foxd1 ノックアウトマウスはホモノックアウト条件では胎生致死であるため、ヘテロノックアウトマウス (Foxd1+/-)の雌雄を掛け合わせ、ワイルドタイプ MEF(Foxd1+/+)、ヘテロノックアウト MEF(Foxd1+/-)、ホモノックアウト MEF(Foxd1-/-)の3種類の MEF を作製した。MEF は E13.5 より採取しているが、ホモノックアウト条件であっても MEF の作製は可能であった。なお、これら3種類の MEF は比較の際は同腹仔を用いており、BrdU 抗体染色により細胞増殖速度が同程度であることが確かめられた(図 7A)。

このワイルドタイプ MEF、ヘテロノックアウト MEF、ホモノックアウト MEF の3種類の MEF を用いてリプログラミング誘導実験を行った。なお、リプログラミング誘導時における Foxd1 の発現上昇はワイルドタイプ MEF、ヘテロノックアウト MEF、ホモノックアウト MEF の順に小さくなった(図 7B)。このとき、リプログラミング効率は Foxd1 の発現量に応じて、ワイルドタイプ、ヘテロノックアウト、ホモノックアウトの順に減少することがわかった(図 7C-D)。リプログラミング効率の減少は、Nanog 抗体染色による Nanog 陽性 iPS 細胞コロニー数の計測、qRT-PCR 解析による Nanog の発現レベルにより確かめられた(図 7C-D)。これらの結果、Foxd1 の発現がリプログラミングにポジティブに寄与しているということが確認された。ただし、Foxd1 ホモノックアウト MEF であってもリプログラミングが誘導できるということは、Foxd1 それ自身がリプログラミングには必須ではないということを示している。

Foxd1 と Foxo1 のダブルノックアウトの与えるリプログラミングへの影響

次に、Foxd1 のホモノックアウト条件下で Foxo1 の発現抑制によるリプログラミングへの影響を調べた。Foxd1 ホモノックアウト MEF に Foxo1 の shRNA レンチウイルスを感染させ、その後3因子レトロウィルスの感染を行いリプログラミング誘導を行った。shRNA による発現抑制の効果は qRT-PCR 解析とウェスタンブロッティングにより確認された(図 8A-B)。そして、この発現抑制におけるリプログラミング効率の変化を調べた。リプログラミング効率の評価は、Nanog 抗体染色による Nanog 陽性 iPS 細胞コロニー数の計測、qRT-PCR 解析による Nanog の発現レベルにより行った(図 8C-D)。いずれの方法においても Foxo1 の発現抑制によりリプログラミング効率の減少が認められた。この結果は、Foxd1 と Foxo1 が別経路でリプログラミングに寄与していることを意味する。あるいは、フォークヘッド型転写因子は多くのサブタイプを持っており、複数の

転写因子が同じ役割を担うという事例が報告されている^{52,53}。本研究においても、Foxd1 のホモノックアウト条件下では、他のフォークヘッド型転写因子が Foxd1 の代わりにその働きを担っているという可能性も考えられる。

Foxd1 はリプログラミング過程で下流遺伝子の発現を制御することでリプログラミングに寄与する

次に、Foxd1 のリプログラミングにおける転写因子としての働きについて考えた。プロモーター解析では、リプログラミングにおける遺伝子発現を引き起こす転写因子として Foxd1 を予測した。では、実際にリプログラミング過程に起こる遺伝子発現変化を Foxd1 が引き起こせるかについて調べることにした。その方法として、リプログラミング過程における Foxd1 下流遺伝子の発現変化が、ワイルドタイプ MEF、ヘテロノックアウト MEF、ホモノックアウト MEF の3種類の MEF でどのように異なるかを qRT-PCR 解析により調べた。Foxd1 が直接制御する遺伝子についての報告がなかったため、本研究ではプロモーター領域に Foxd1 結合配列を有している遺伝子についてその発現変化を調べることにした。Dax1、Epcam、Necab1、Il7r は、プロモーター領域に Foxd1 結合配列を持ち、リプログラミング過程において発現が上昇していた遺伝子である。これらの遺伝子は、多くの場合 Foxd1 の発現量に応じた発現上昇(ワイルドタイプ MEF>ヘテロノックアウト MEF>ホモノックアウト MEF)を示していた(図 9A)。この結果より、これらの遺伝子がリプログラミング誘導時に発現が上昇した Foxd1 により制御されている可能性が示唆された。

また、これらの遺伝子の中で、Dax1(dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1)は ES 細胞の多能性の制御に関わるオファン核内受容体であり、Dax1 を ES 細胞で発現抑制ないしノックアウトさせると多能性を維持できなくなることが報告されている⁵⁴⁻⁵⁸。本研究では、この Dax1 の発現抑制によりリプログラミング効率が変化するかどうかを調べた(図 9B)。その結果、Nanog 抗体染色による Nanog 陽性 iPS 細胞コロニー数の計測により、リプログラミング効率が減少することが分かった(図 9D)。また Epcam(Epithelial cell adhesion molecule)は MET の指標として知られ、リプログラミングに深く関与していることが報告されている細胞接着因子である^{8,59,60}。リプログラミング過程で発現の上昇した Foxd1 はこれらの下流遺伝子の発現を制御しリプログラミングに寄与しているということが可能性として考えられる。

さらに、Foxd1 ノックアウト細胞を用いたリプログラミングにおいてマイクロアレイ

解析を行い、先に行ったマイクロアレイ解析(ワイルドタイプ MEF を用いたマイクロアレイ解析)と組み合わせて Foxd1 下流遺伝子の探索を行った。Foxd1 ノックアウト細胞を用いたマイクロアレイは、ワイルドタイプ MEF、ヘテロノックアウト MEF、ホモノックアウト MEF の3種類の MEF について Day 8 でサンプルを回収しマイクロアレイを行った。先のマイクロアレイ解析で発現が上昇していた 813 プローブセット(表 1)の中で、38 プローブセットが Day 8 においてホモノックアウト MEF における発現量がワイルドタイプ MEF における発現量の 80 パーセント以下となっていた(図 9D・表 2)。この中には Nanog、Oct4、Dax1 など多能性の維持に必要な転写因子や、先に Foxd1 の下流として予測された Dax1 や Il7r とも含まれていた(図 9D・表 2)。この中に Foxd1 の下流遺伝子が含まれていることが期待される。さらに、この 38 遺伝子について Gene ontology 解析を行ったところ、多能性の維持に関わる Gene ontology term である stem cell maintenance が最も低い p-value(3.69×10^{-6})となった(図 9E)。この結果もまた、Foxd1 が下流遺伝子を制御することでリプログラミングに寄与していることを示唆するものである。

Foxd1 の過剰発現はリプログラミング効率を上げない

次に、Foxd1 の過剰発現のリプログラミングに与える影響について調べた。これまでに行ってきた実験は shRNA やノックアウトマウスを用いた発現抑制の実験であり、Foxd1 の過剰発現については実験を行っていない。本研究では、3 因子と併せて Foxd1 を発現させるレトロウィルスの感染を行い、3 因子・Foxd1 とコントロールとして 3 因子・GFP を比較し、リプログラミング効率に差が生じるかを調べた。

qRT-PCR 解析の結果、Foxd1 の発現は Day 8 のピーク時で約 4 倍まで上昇した(図 10A)。なお、本実験では、内在性の Foxd1 の発現とウィルス由来の Foxd1 の発現を区別することができない。この Foxd1 の過剰発現条件下において qRT-PCR 解析により多能性マーカーである Nanog の発現レベルを調べたところ、Foxd1 の過剰発現により約 70 パーセント程度に抑えられることが分かった(図 10B)。また、FACS 解析による Nanog 陽性細胞の割合を調べたところ、同様にリプログラミング効率の減少が認められた(図 10C)。しかし、驚いたことに Nanog 抗体染色による iPS 細胞コロニーカウントではその差は認められなかった(図 10D)。これらの結果は、Nanog を発現するに至らなかった細胞の数が增多していることを示唆する。その結果、細胞数によって補正を受ける qRT-PCR 解析による Nanog 発現レベルと FACS 解析による Nanog 陽性細胞の割合が、大きく減少したものと考えられる。それを裏付けるように、リプログラミング過程での顕微鏡写真

では Foxd1 の発現により細胞数が増えていることが認められた(図 10E)。MEF の状態における Foxd1 の有無は細胞増殖への影響がなかった(図 7A)ため、Foxd1 の過剰な発現により増殖が速くなる可能性や、3 因子がある条件で初めて増殖が速くなるという可能性が考えられる。

これまでは主に Foxd1 がリプログラミングに与える影響について述べてきた。これより、リプログラミング過程における Foxd1 のマーカーとしての意義について述べる。

2 因子や 1 因子の発現は、Foxd1 の発現上昇には不十分である

まず、Foxd1 が発現上昇する条件について調べた。Foxd1 の発現上昇が 3 因子でも 4 因子と同様起こるということは先に述べた(図 5B)が、2 因子、1 因子でもその発現上昇が生じるかどうかを調べた。qRT-PCR 解析の結果、2 因子(Sox2-Oct4、Sox2-cMyc、Sox2-Klf4、Oct4-cMyc、Oct4-Klf4、cMyc-Klf4 の 6 パターン)では、Sox2-cMyc、Oct4-cMyc を除く 4 パターンでは発現はまったく上昇しなかった(図 11A)。Sox2-cMyc、Oct4-cMyc においてはわずかに発現の上昇がみられたものの、その程度は 4 因子に比べて小さなものであった(図 11A)。また、1 因子(Oct4、Sox2、Klf4、cMyc をそれぞれ発現させた 4 パターン)では、Foxd1 の発現上昇はほとんど起こらなかった(図 11B)。脂肪組織由来細胞に Oct4 を過剰発現させると Foxd1 の発現が上昇するという報告もあったが、本研究で行った MEF に 1 因子を発現させる実験系では Foxd1 の発現上昇は起こらなかった⁶¹。発現がわずかに上昇した Sox2-cMyc、Oct4-cMyc に共通の cMyc であっても、単独発現の場合や Klf4 との 2 因子の場合には発現が上昇しなかった(図 11A-B)。また、多能性マーカーである Nanog の発現は、Sox2-cMyc、Oct4-cMyc 含めて 2 因子条件では上昇しなかった(図 11A)。4 因子、3 因子、2 因子、1 因子における Foxd1 の挙動の違いは、Foxd1 の発現上昇がウィルス由来の転写因子の発現により自動的に起こることではなく、MEF の状態から脱した細胞状態であることが重要であるということを示唆する。

Foxd1 の発現上昇はリプログラミングが進行した細胞特異的に起こる

次に Foxd1 を発現する細胞の性質について考えた。Foxd1 を発現する細胞がどの程度存在するのか、そして Foxd1 を発現した細胞はリプログラミングが進んだ細胞と言えるのか。ここで、先より用いている Foxd1-Cre-EGFP マウス由来のヘテロノックアウト MEF を Foxd1 レポーター細胞として用いた。この MEF は Foxd1 の発現を EGFP の蛍光より検出することができる(図 12A)⁴⁰。この MEF に対してリプログラミングを誘導し

た時の GFP 陽性細胞(すなわち Foxd1 発現細胞)の推移を、FACS 解析により調べた。FACS 解析の結果、Foxd1 発現細胞は Day 6 頃(9.7%)より現れ始め、時間の経過とともにその割合を増し Day 10 頃(33.4%)最も高い割合を示し、その後減少することがわかった(図 12B)。また、iPS 細胞となり Nanog を発現するようになった細胞は Foxd1 を発現しないことがわかった(図 12C)。Foxd1 発現細胞の最も高くなる割合は実験回により異なるものの概ね 30-40%程度であった。これらの結果は、qRT-PCR 解析における Foxd1 の発現変化と一致するものである(図 4D・図 5B)。qRT-PCR 解析における発現量は細胞集団レベルでのシグナル値であり、同一細胞における発現量の増加と発現する細胞数の増加を区別することはできない。この Foxd1 レポーター細胞の解析より初めて、Foxd1 の発現がリプログラミングを誘導したすべての細胞に起こるのでなく、ある限定された集団にのみ起こることが示された。なお、この Foxd1 レポーター細胞の GFP の蛍光強度は非常に弱いものであったため、FACS 解析では検出できるものの蛍光顕微鏡で検出することはできなかった。

次に、この Foxd1 を発現した細胞がリプログラミングが進んだ細胞であるのかを調べるため、Foxd1 発現細胞と未発現細胞をそれぞれ分取し播き直し、後にできる iPS 細胞コロニーの数を比較した。セルソーティングは Day 8 で行い、iPS 細胞コロニー数の出現を待つて(Day 18-)Nanog 抗体染色を行った(図 13A)。その結果、Foxd1 発現細胞からより多くの iPS 細胞コロニーが出現した(図 13B)。さらに、Day 8 で行うセルソーティングを Foxd1 の発現量に応じて Foxd1 ++、Foxd1 +、Foxd1 -の 3 つの集団への分画とし(Foxd1 発現細胞の中でより高い発現を示す細胞集団を Foxd1 ++、Foxd1 発現細胞の中でより低い発現を示す細胞集団を Foxd1 +、Foxd1 発現未細胞を Foxd1 -とした)同様の実験を行ったところ、Foxd1 ++、Foxd1 +、Foxd1 -と Foxd1 の発現の高い細胞からより多くの iPS 細胞が出現するという結果が得られた(図 13C-D)。

以上の結果より、Foxd1 を発現する細胞はリプログラミングがより進んだ細胞であるということがわかった。すなわち Foxd1 がリプログラミングの進行を示すマーカー遺伝子であることがわかった。

Foxd1 の有無による細胞状態の違いは、その時期により異なる

次に、Foxd1 発現細胞と未発現細胞における遺伝子発現の違いを調べた。ここでは、セルソーターを用いて Foxd1 発現細胞と未発現細胞をそれぞれ分取し、qRT-PCR 解析により遺伝子発現の違いを調べた。細胞のソートは Day 6-14 で行った。まず、いずれの時点においても GFP 陽性細胞では GFP とともに Foxd1 が高く発現していることを確

認した(図 14A)。次に、Nanog、Oct4 の 2 種類の多能性マーカーの発現を調べた。その結果、Foxd1 発現初期(Day 6-8)では GFP 陽性細胞により高い多能性マーカーの発現が認められたが、それ以降の時期では発現が逆転し GFP 陽性細胞がより低い多能性マーカーの発現を示すようになった(図 14C-D)。この結果は、Foxd1 が Nanog や Oct4 といった多能性マーカーが発現する時期以前に一過的に発現することを示唆する。ただし、検出している GFP(正確には EGFP-Cre)と Foxd1 のタンパク質としての性質の違い(フォールディング速度や分解速度、活性のために必要な濃度など)がわからないため、Foxd1 と Nanog や Oct4 といった多能性マーカーの発現の時間的なずれの判断は難しい。ただ、Nanog と Oct4 の発現上昇のタイミングについては、Nanog よりも Oct4 の発現がより遅くに起こっているものと考えることができる。なぜなら、Foxd1 発現後期(Day 10-14)での Foxd1 発現細胞と未発現細胞における発現量差が、Oct4 は Nanog に比べて大きくなっているからである(図 14C-D)。

次に、Foxd1 の下流と予測された 4 遺伝子(Dax1、Epcam、Necab1、Il7r)の発現変化について調べた。4 遺伝子のうち Dax1 は、Nanog や Oct4 と同じ発現変化の傾向を示した(図 14E)。すなわち、Foxd1 発現初期(Day 6-8)では GFP 陽性細胞により高い発現を示したが、それ以降の時期では発現が逆転し GFP 陽性細胞により低い発現を示すようになった。残りの 3 遺伝子、Epcam、Necab1、Il7r はサンプリングを行ったすべての時点で Foxd1 発現細胞においてより高い発現量を示した(図 14F-H)。下流と予測された遺伝子であってもその発現パターンが異なるという結果が得られた。多能性を制御する転写因子はネットワーク構造をとっており、1 つの転写因子が複数の転写因子を制御しそして制御されている^{54,55}。Dax1 もまた複数の転写因子より制御を受けると考えられている^{54,55}。Foxd1 の発現が ES 細胞や iPS 細胞で高くないということ(図 5B)からも、Foxd1 が多能性幹細胞で積極的に働いているとは考えにくい。すなわち、Dax1 に関しては、多能性マーカーが発現する(多能性を制御する転写ネットワークが働き始める)以前の時期において Foxd1 が作用しているものと考えられる。そして、それ以降の時期では Dax1 は多能性を制御する転写ネットワークによって高い発現が維持されると考えられる。

最後に、体細胞マーカーである Thy1 について調べた。Thy1 は MEF のような分化した細胞では発現しているが、ES 細胞、iPS 細胞のような多能性幹細胞では発現していない⁸。この Thy1 について qRT-PCR 解析を行うと、先の多能性マーカーとは逆の挙動、すなわち Foxd1 発現初期(Day 6-10)では Foxd1 未発現細胞により高い発現を示し、後期(Day 12-14)では Foxd1 発現細胞により高い発現を示した(図 14I)。この結果は、Foxd1 の発現の有無により生じる遺伝子発現の違いが、Foxd1 発現初期と後期で入れ替わると

いう多能性マーカーの挙動と同じ性質を持っている。

これらの結果から以下のように考えられる(図 14J)。リプログラミングの開始時点である MEF では、Foxd1 の発現はなく体細胞マーカーである Thy1 が発現している。3 因子や 4 因子により Foxd1 の発現が上昇し始めた頃(Day 6-8)、Foxd1 発現細胞において Thy1 の発現が減少し、かつ多能性マーカーである Nanog の発現が上昇し始める。さらに時間が進むと、Foxd1 を一過的に発現しその後に発現が減少した細胞と最初からずっと Foxd1 を発現していない細胞という、2 種類の Foxd1 未発現細胞が存在するようになる。このうち前者は iPS 細胞を意味し Thy1 の発現は低く、Nanog の発現は高い。後者は Thy1 の発現が維持され、Nanog は未発現の状態のままとなっている。

多くの iPS 細胞は Nanog の発現までに Foxd1 の発現を経験する

さらなる Foxd1 とリプログラミングの相関を調べるために、Foxd1 発現細胞の運命追跡実験を行った。先に行ったソーティングからの iPS 細胞コロニー数の比較では、播き直しの後コロニー形成までに 1 週間以上時間が必要であり、その間に Foxd1 の発現が上昇するということが考えられた。すなわち、Day 8 においてリプログラミングが進行しているか否かの判断はできるが、Foxd1 の発現上昇がリプログラミングにどれだけ特異的に起こるのかについての判断はできなかった。そこで、先より用いている Foxd1-Cre-EGFP マウスと CAG-loxp-EGFP マウスを掛け合わせ、Foxd1 プロモーターにより発現した EGFP-Cre による部位特異的組換えが起こる結果、以後恒常的に EGFP を発現し続ける MEF を作製した(図 15A)⁶²。なお、MEF は E13.5 の胎児より作製したが、E13.5 胎児の時点で、目周辺やヒゲの毛根付近に強い GFP の発現が見られた(図 15B)。これらの組織では Foxd1 が発生段階に関与していることが予想される。また、MEF の時点で約 10 パーセントの GFP 陽性細胞(すなわち Foxd1 の発現を経験した細胞)が含まれていたが、リプログラミングに先立ってセルソーティングを行い GFP 陽性細胞を除去している(図 15C)。なお、MEF の時点での Foxd1 発現経験細胞と未経験細胞について多能性マーカーである Nanog と未分化マーカーである SSEA1 の抗体染色を行ったが、細胞間に差は見られなかった(図 15D)。

この MEF を用いてリプログラミングを誘導し GFP 発現細胞(すなわち Foxd1 発現経験細胞)の推移を、FACS 解析により調べた。GFP 発現細胞は Day 6-8 頃より出現し時間の経過とともに割合を増やし、Day 12-14 頃最大となる 30-40 パーセントとなりそれ以降も 30 パーセント以上という高い値をとり続けた(図 15E)。検出される GFP の蛍光は、Foxd1 プロモーターにより発現される EGFP-Cre と CAG プロモーターにより発現される

EGFP に由来するが、本解析では一定の閾値以上の GFP の蛍光強度を持つ細胞を Foxd1 発現経験細胞としている。なお、この部位特異的組換えはリプログラミングの誘導に依存して起こるものであり、mCherry を発現させるレトロウィルスの感染では起こらなかった(図 15F)。

さらに、この MEF を用いて、Foxd1 の発現経験と Nanog 発現の相関を FACS 解析により調べた。その結果、Nanog を発現する細胞は、先ず Foxd1 の発現を経験しその後に Nanog を発現するようになるということが分かった(図 16A)。この FACS 解析について各細胞の割合を定量すると、Nanog を発現した細胞のうち 79.0 パーセント(GFP 陽性細胞/ Nanog 陽性細胞= 23.7 %/ 30.0%)が Foxd1 の発現を経験していた(図 16B)。さらに、蛍光顕微鏡観察による iPS 細胞コロニー数により評価を行うと、Nanog を発現した iPS 細胞コロニーのうち 95.1 パーセント(GFP 陽性コロニー/ Nanog 陽性コロニー= 311 個 / 327 個)がそれまでに Foxd1 の発現を経験しており、非常に高い相関が得られることがわかった(図 16C)。これらの結果、Foxd1 を発現することが後に Nanog を発現する細胞特異的に起こる現象であることが強く示唆された。

Foxd1 の発現と SSEA1 の発現のタイミングは細胞により異なる

次に、Foxd1 の発現上昇のタイミングが未分化マーカーである SSEA1 とどのような関係にあるかについて調べた。Day 4-14 にかけて計 6 時点で SSEA1 抗体染色を行い、GFP の発現(すなわち Foxd1 の発現経験)と SSEA1 との相関を調べた。その結果、Foxd1 発現経験の細胞が必ずしも SSEA1 を発現しているわけではなく、また SSEA1 陽性細胞が Foxd1 の発現を経験しているわけではなかった(図 17A)。しかし、時間の経過とともに Foxd1 発現経験と SSEA1 発現は相関を強めた(図 17B)。この結果は、リプログラミングには複数の満たすべきステップがあり、それらは(本研究の場合 Foxd1 の発現と SSEA1 の発現)が順番を問わないステップであることを示唆している。

Foxd1 の発現の有無は iPS 細胞の状態に影響を与えない

Foxd1 発現細胞の運命追跡実験では、数パーセント程度の Foxd1 の発現を経験しないままにリプログラミングされた細胞が存在していた(図 16B-C)。そこで、Foxd1 の有無によって iPS 細胞の性質に違いがあるかどうか、あるならばそれはどのような違いであるのかを、ホモノックアウト MEF 由来の iPS 細胞とワイルドタイプ MEF 由来の iPS 細胞を比較することによって調べた。

iPS 細胞は様々な組織への分化能と増殖能を持った細胞であり、その樹立の証明のた

めには様々な実験が必要とされる。それら各種の実験において Foxd1 の有無によって iPS 細胞の品質に違いが生じるかを検証した。行った実験は、①ウィルス由来の外来遺伝子のサイレンシング、②内在性の多能性マーカー(Sox2、Oct4、Klf4、Nanog、E-cadherin)の発現、③多能性マーカー(Oct4、Nanog)プロモーター領域の DNA メチル化状態、④胚様体形成による in vitro 分化誘導における三胚葉系への分化の評価、⑤テラトマ形成による in vivo 分化誘導における三胚葉系への分化の評価、そして⑥キメラマウスの作製である。これらの実験を、ホモノックアウト iPS 細胞 2 ライン(#2 と #5)、ワイルドタイプ iPS 細胞 2 ライン(#2 と #5)の合計 4 種類の iPS 細胞ラインについて比較を行った。

①ウィルス由来の外来遺伝子のサイレンシングは、3 因子を感染させて 8 日目の発現レベルを 1 とし、iPS 細胞におけるそのサイレンシングの程度をその相対値として評価した(図 18)。いずれの細胞ラインもウィルス由来の Oct4、Sox2、Klf4 の発現は見られなかった。

②内在性の多能性マーカーの発現は、Sox2、Oct4、Klf4、Nanog については qRT-PCR 解析により mRNA レベルで、E-cadherin、Oct4、Nanog についてはウェスタンブロッティングによりタンパク質レベルでの確認を行った(図 19A-B)。qRT-PCR 解析の結果はややワイルドタイプが高い傾向があったが、ウェスタンブロッティングでは同様の結果は得られなかった。この結果に関して、ホモノックアウトとワイルドタイプで差があったとしても、それは細胞状態の揺らぎに及ばない程度の差であると考えている。

③多能性マーカー(Oct4、Nanog)プロモーター領域の DNA メチル化レベルは、メチル化 DNA を検出するバイサルファイトシーケンス法を用いて検出した。この方法は、メチル化されたシトシンにおいてはバイサルファイト反応が起こらないことを利用して、ゲノム上の特定の領域の DNA のメチル化の有無について判別する方法である⁶³。多能性マーカー遺伝子のプロモーター領域は、MEF ではメチル化されており、多能性幹細胞では脱メチル化されていることが知られる^{2,64}。調べた 4 つの iPS 細胞ラインでは Oct4 プロモーター領域、Nanog プロモーター領域共に脱メチル化されており、ホモノックアウト条件とワイルドタイプ条件に差は確認できなかった(図 20)。

④胚様体形成による in vitro 分化誘導における分化の評価は、iPS 細胞より胚様体を形成しその後接着培養することで分化誘導を促し、各胚葉特異的なマーカーの発現を調べることで行った(図 21A)。qRT-PCR 解析では、Afp、Gata6(以上、内胚葉マーカー)、Gata4、Smooth muscle actin (以上、中胚葉マーカー)、Cdx2、Nestin(以上、外胚葉マーカー)のすべてにおいて胚様体形成により発現が上昇したが、ホモノックアウト条件

とワイルドタイプ条件に有意な差はなかった(図 21B)。また、各分化マーカーの抗体染色によっても三胚葉系への分化を確認した(図 21C)。ここで Afp、Foxa2 は内胚葉マーカー、 α -sarcomeric actinin、Gata4 は中胚葉マーカー、Tuj1、Gfap は外胚葉のマーカーである。

⑤テラトーマ形成による in vivo 分化誘導における分化の評価は、テラトーマの大きさと組織切片の観察から行った。各 iPS 細胞を同じ細胞数ずつ 10 週齢の Balb/c -nu/nu 雌マウスに皮下注射を行い 5 週間後にマウスを解剖しテラトーマを評価した(図 22A)。1 ラインにつき 5 か所、計 4 ライン 20 か所の注射を、10 個体左右 2 か所の計 20 か所について行った。左右の違いをなくするため 5 個体に左ホモノックアウト iPS 細胞、右ワイルドタイプ iPS 細胞とし、残り 5 個体に左右を逆転させて注射した。その結果、ワイルドタイプ iPS 細胞#2 とホモノックアウト iPS 細胞#5 に関してはホモノックアウト iPS 細胞の方がテラトーマが大きくなるという結果が得られた(図 22B)。しかし、残り 5 個体のワイルドタイプ iPS 細胞#5 とホモノックアウト iPS 細胞#2 に関しては、大きさに違いはなかった(図 22C)。ワイルドタイプ iPS 細胞#2 とホモノックアウト iPS 細胞#5 に関しては差があったものの、ホモノックアウト条件とワイルドタイプ条件に一貫した差は見出せなかった。また、このテラトーマに関して、パラフィン包埋を行い切片を作製し HE 染色により三胚葉への分化を確認している(図 22D)。

最後に、⑥キメラマウスを作製し、その iPS 細胞の「キメラの出来やすさ」を調べた。多能性幹細胞は受精卵(胚盤胞)に注入され、ホストたる細胞と同じく個体の形成に寄与(すなわちキメラマウスの作製)できることが知られる^{4,7}。4 つの iPS 細胞ラインについてキメラマウスを作製しその寄与率から「キメラの出来やすさ」を評価した(図 23)。なお、その寄与率は毛色(iPS 細胞は C57BL/6 マウスであり毛色は茶色、ホストマウスは ICR マウスであり毛色は白色)より判断した。その結果、いずれの iPS 細胞においてもキメラに寄与できることが分かった。その寄与率の違いについては、ホモノックアウト条件とワイルドタイプ条件に差があるという結果は得られなかった。

以上、本研究においてはホモノックアウト MEF 由来の iPS 細胞とワイルドタイプ MEF の由来の iPS 細胞をの差を検出することはできなかった。

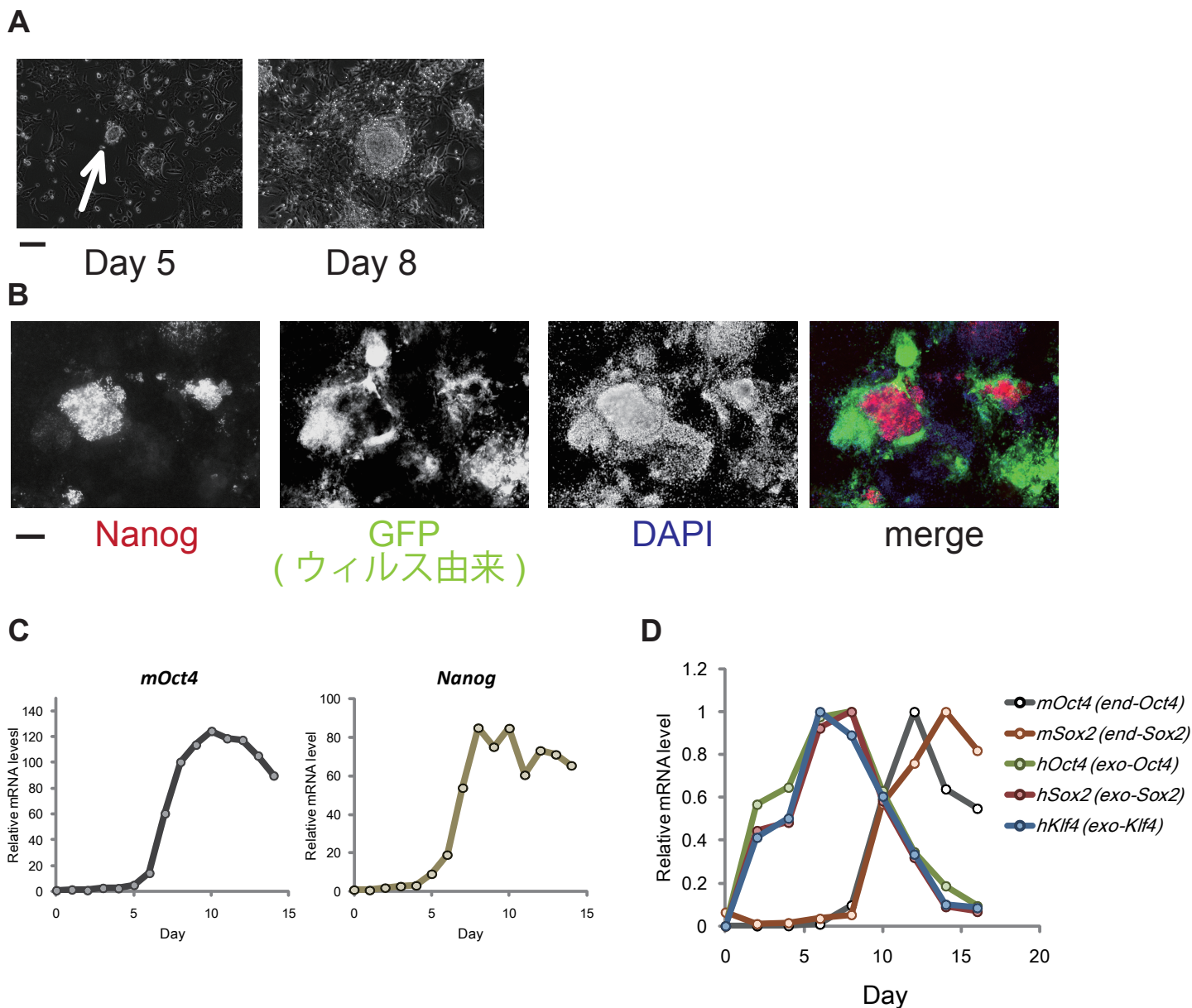


図2 リプログラミングの細胞の変化とそのタイムスケール

(A) リプログラミング過程の顕微鏡写真。Day 5 の時点で iPS 細胞様のコロニーが出現している (矢印)。

Day 8 頃にはコロニーは大きくなっている。Scale bar = 200 μ m。

(B) iPS 細胞コロニーの顕微鏡写真。Day 9 において、多能性マーカーである Nanog 抗体染色、GFP(4 因子と共に感染させたウイルス由来)、DAPI 染色と merge 画像。コロニーの中でも Nanog が発現する細胞はウイルスがサイレンシングされている傾向にある。Scale bar = 200 μ m。

(C) 多能性マーカーである Oct4 と Nanog の発現量の変化。4 因子感染によるリプログラミングにおける内在性 Oct4(mouse Oct4) と Nanog の発現上昇は Day 6 頃より始まる。その後 Day 8-10 頃に発現のピークをとり、以後高い値を維持し続ける。それぞれ Day 0 に対する相対値を示している。

(D) human 由来遺伝子と mouse 由来遺伝子の発現量の比較。リプログラミングを誘導する転写因子は human 由来であるため、プライマーにより内在性の発現 (mouse 由来) とウイルス由来の発現 (human 由来) を区別することができる。それぞれ最大となった時点 (*mOct4*: Day 12、*mSox2*: Day 14、*hOct4*: Day 8、*hSox2*: Day 8、*hKlf4*: Day 6) に対する相対値を示している。

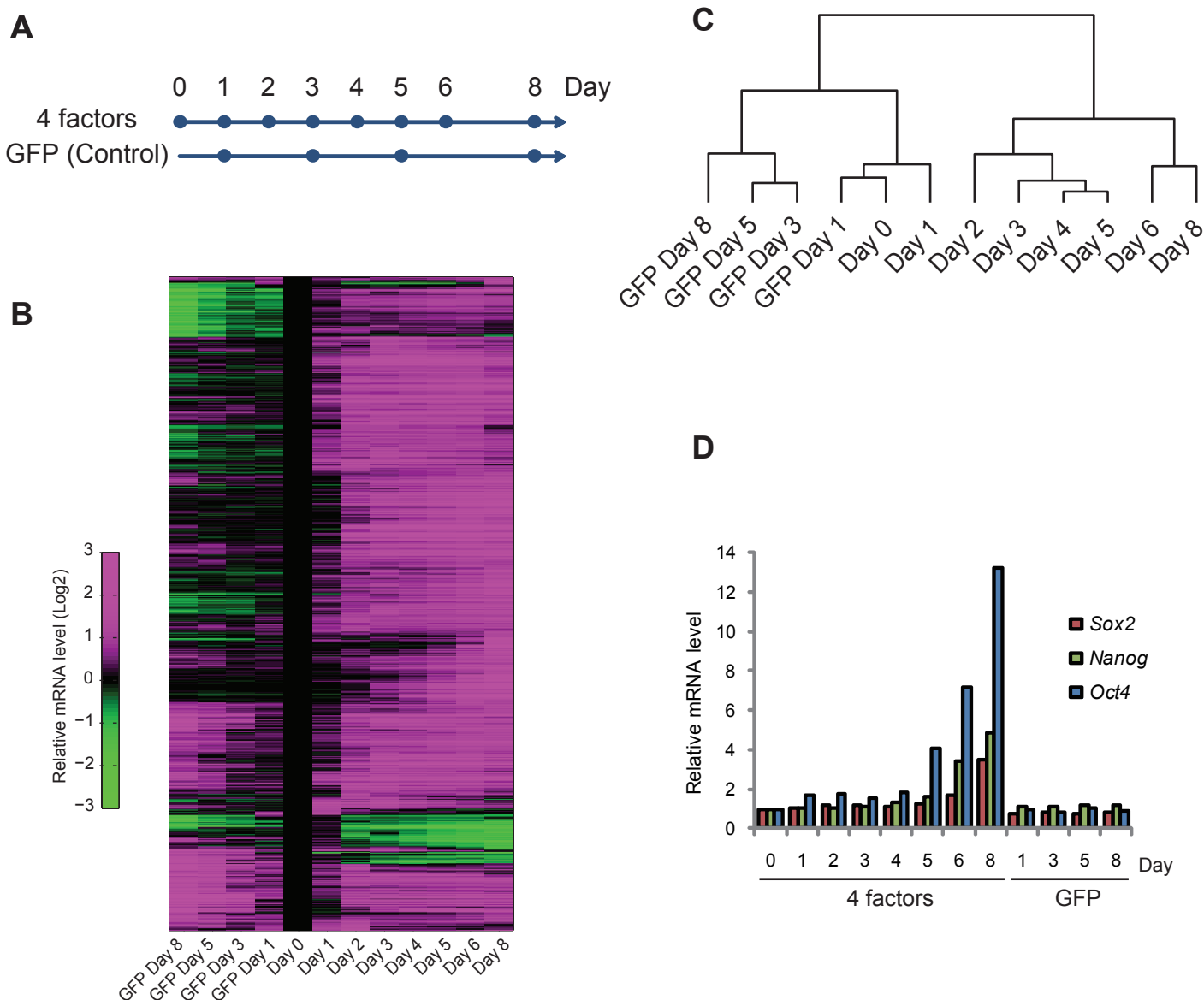


図3 マイクロアレイ解析とそのクラスタリング解析

(A) マイクロアレイ解析のタイムコース。MEF(Day 0) と 4 因子感染群 7 時点 (Day 1、Day 2、Day 3、Day 4、Day 5、Day 6、Day 8) と GFP 感染群 4 時点 (GFP Day 1、GFP Day 3、GFP Day 5、GFP Day 8) の計 12 時点についてマイクロアレイ解析を行った。

(B) 発現が上昇した遺伝子のヒートマップ。マイクロアレイ解析の結果、MEF(Day 0) に対して発現量が 2 倍以上となったプローブセットが 813 個見出された。

(C) 発現が上昇した 813 個のプローブセットについて行ったクラスタリング解析。Day 0 と Day 1 と GFP Day 1、GFP 感染群 (GFP Day 3, 5, 8)、4 因子感染群 (Day 2, 3, 4, 5, 6, 8) は、それぞれ比較的近い遺伝子発現プロファイルを持っている。4 因子感染群の中でも Day 6 と Day 8 は比較的近く、その他の 4 因子感染群と少し異なった遺伝子発現プロファイルを示している。

(D) 多能性マーカーである Sox2、Nanog、Oct4 の発現量の変化。マイクロアレイ解析において、Sox2、Nanog、Oct4 の発現上昇を確認した。これらの転写因子はコントロールである GFP のみの感染では発現上昇が起こらない。それぞれ Day 0 に対する相対値を示している。

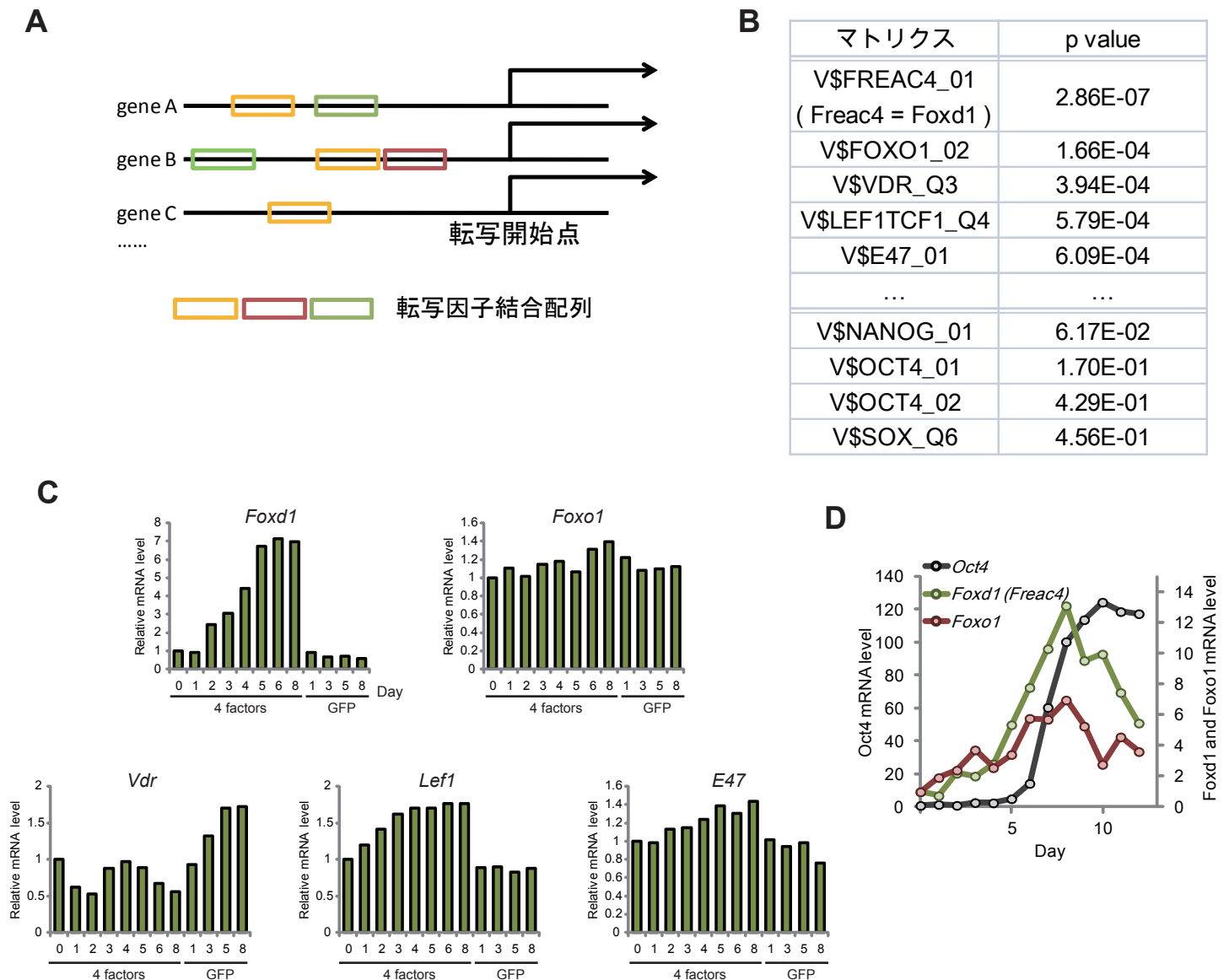


図4 マイクロアレイ解析を基にした新規リプログラミング制御因子の予測

(A) プロモーター解析の模式図。転写開始点上流 1200 塩基対についてマトリクス (転写因子結合サイト) が存在するかを調べ、統計学的な評価を行った。

(B) プロモーター解析の結果。Day 8 において発現が上昇していた 411 遺伝子について行ったプロモーター解析では、Freac4(Foxd1) や Foxd1 のマトリクスが高頻度に存在していた。p-value の小さかったマトリクスの上位 5 個 (Freac4(Foxd1)、Foxd1、Vdr、Lef1Tcf1、E47) と Nanog、Oct4、Sox の p-value を示している。なお、p-value はフィッシャーの正確確率検定 (片側) で行った。

(C) プロモーター解析の上位 5 転写因子の発現量の変化。プロモーター解析の上位 5 転写因子 (Foxd1、Foxo1、Vdr、Lef1、E47) の中で Foxd1 の発現上昇が最も大きかった。Foxo1、Lef1、Tcf3 の発現量はコントロールである GFP 発現時においては変化せず、4 因子発現時ではわずかに上昇している。

(D) Foxd1、Foxd1、Oct4 の発現上昇のタイミングの比較。Oct4 は Day 6-8 頃にピーク値の半分の値に達する ($T_{1/2}$ = Day 6-8) が、Foxd1 と Foxo1 は Day 4-6 頃にピーク値の半分の値に達する ($T_{1/2}$ = Day 4-6)。なお、Oct4 の発現変化は左軸、Foxd1 と Foxo1 の発現変化は右軸によって示される。それぞれ Day 0 に対する相対値を示している。

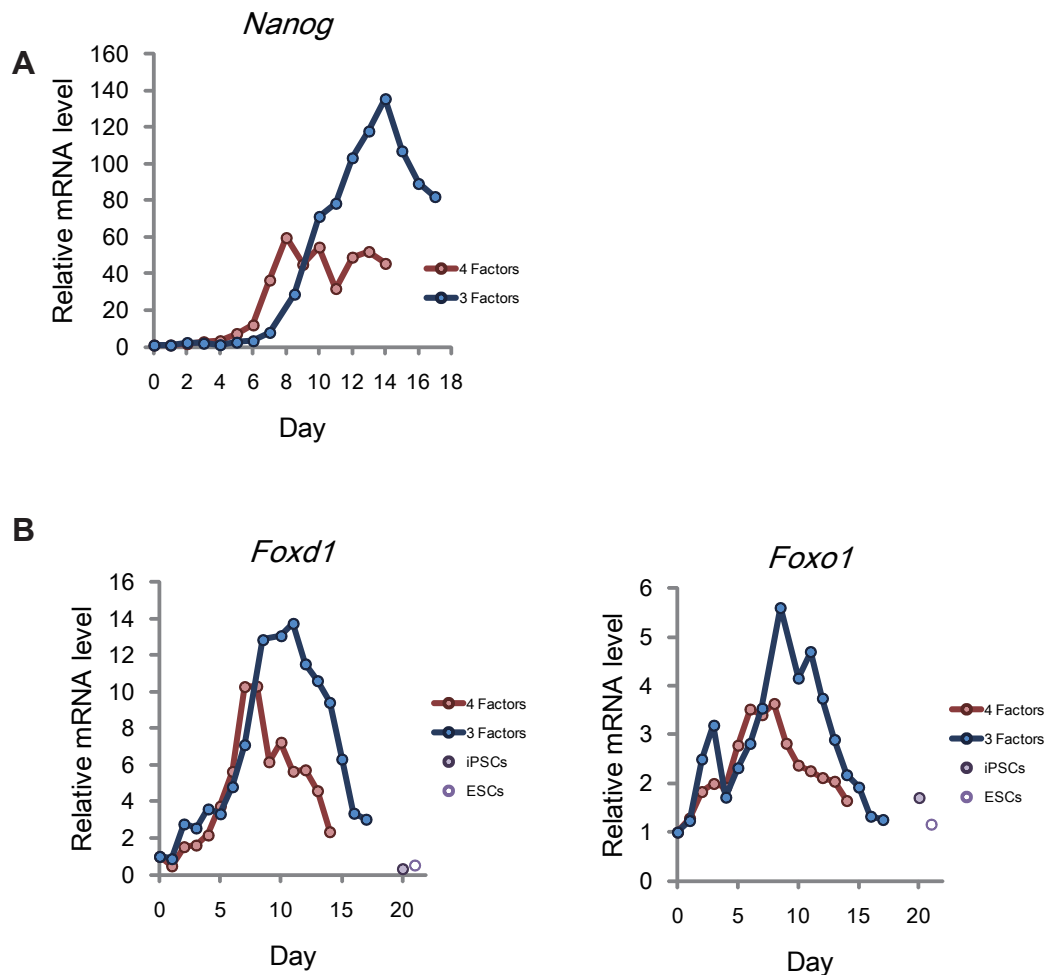


図5 4因子によるリプログラミングと3因子によるリプログラミングの比較

(A) *Nanog* の発現量の変化。3因子の場合、4因子に比べて発現上昇の時期が遅くなり (T1/2 を比較すると $T1/2(3F) = \text{Day } 6-8$ に対して $T1/2(4F) = \text{Day } 4-6$ である)、ピーク値は大きくなった。ともに Day 0 に対する相対値を示している。

(B) *Foxd1* と *Foxo1* の発現変化。*Nanog* と同じく発現上昇の時期の遅れとピーク値の減少が認められた。また、iPS細胞やES細胞といった多能性マーカーでは、*Foxd1* の発現はほとんど検出できず、*Foxo1* の発現はMEFと同程度の比較的低い値に抑えられている。いずれも Day 0 に対する相対値を示している。

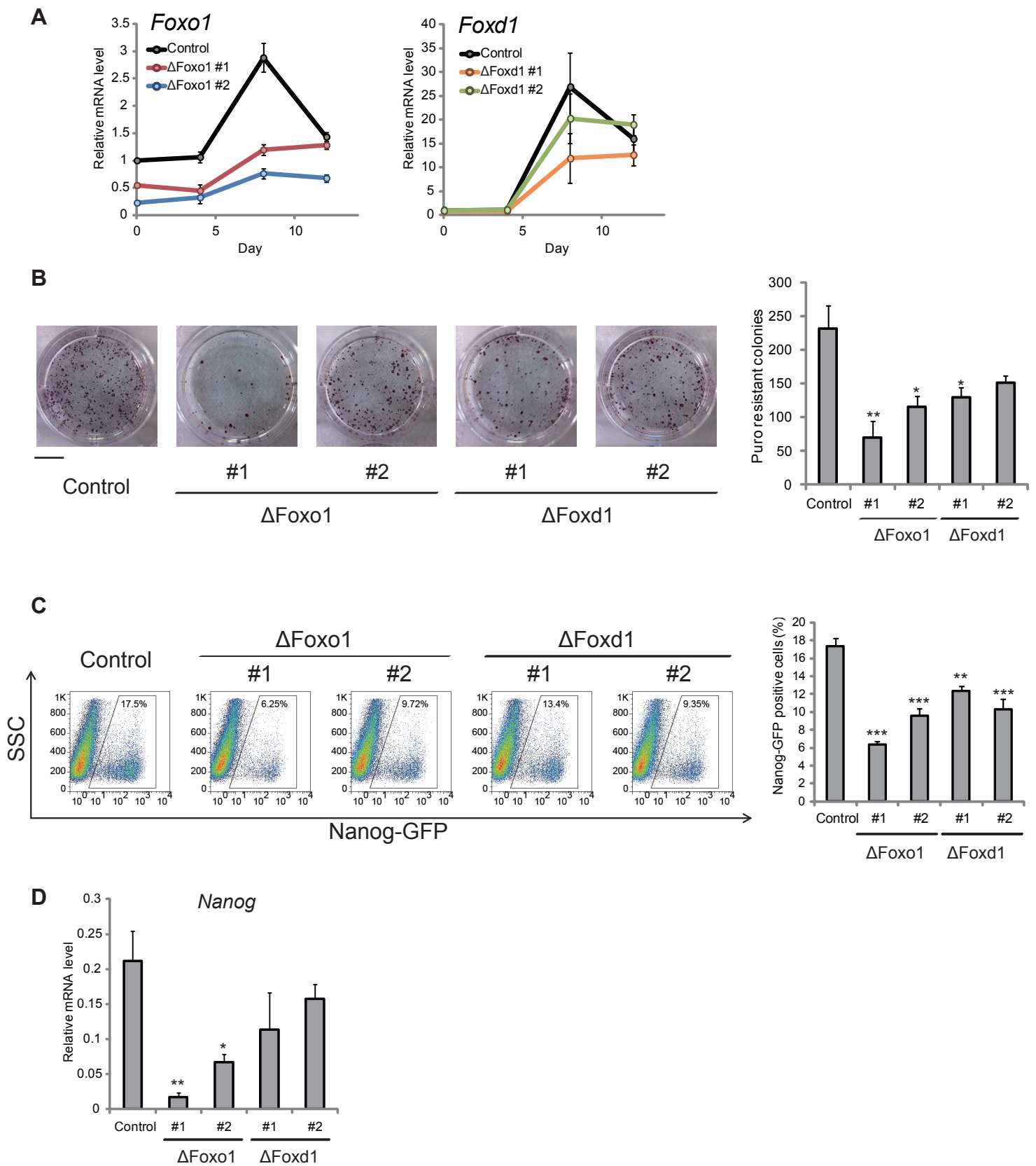


図6 Foxo1 と Foxd1 の発現抑制によるリプログラミング効率の減少

図6 Foxo1 と Foxd1 の発現抑制によるリプログラミング効率の減少

MEF に対してコントロール shRNA、Foxo1 をターゲットとする shRNA2 種、Foxd1 をターゲットとする shRNA2 種をレンチウイルスによって感染させ、3 日後に 3 因子のレトロウイルスを感染させてリプログラミングを誘導した。Nanog-GFP-IRES-PuroR マウス由来の MEF を用いて実験を行っている。なお、グラフについて p-value は Dunnett 法により算出した (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, and * $p < 0.05$)。

(A) shRNA による Foxo1 と Foxd1 の発現抑制の効果。Foxo1 は shRNA により発現上昇がほとんど見られなくなったが、Foxd1 は shRNA 条件でも発現上昇が起こっている。グラフは独立 3 回の平均値 \pm SEM を示している。

(B) iPS 細胞コロニー数の計測。puromycin によるセレクションの後アルカリフォスファターゼ染色を行い、iPS 細胞コロニーの数を数えた。puromycin によるセレクションでは Nanog を発現する細胞のみが生き残る。3 因子を感染させた後 Day 14 より $1 \mu\text{g/ml}$ の puromycin を培地に添加し、Day 20 にて固定しアルカリフォスファターゼ染色を行った。Scale bar = 10mm。グラフは独立 3 回の平均値 \pm SEM を示している。

(C) Nanog 発現細胞の割合の定量。FACS 解析は Day 12 に行った。ゲート内に含まれる細胞の割合を併せて示している。shRNA による発現抑制により、全体の細胞に対する iPS 細胞の割合が減少した。グラフは独立 4 回の平均値 \pm SEM を示している。

(D) Nanog 発現量の定量。qRT-PCR 解析は Day 8 に行った。shRNA による発現抑制により、単位当たりの Nanog の発現量が減少している。グラフは独立 4 回の平均値 \pm SEM であり、iPS 細胞における Nanog 発現量に対する相対値を示している。

図 7

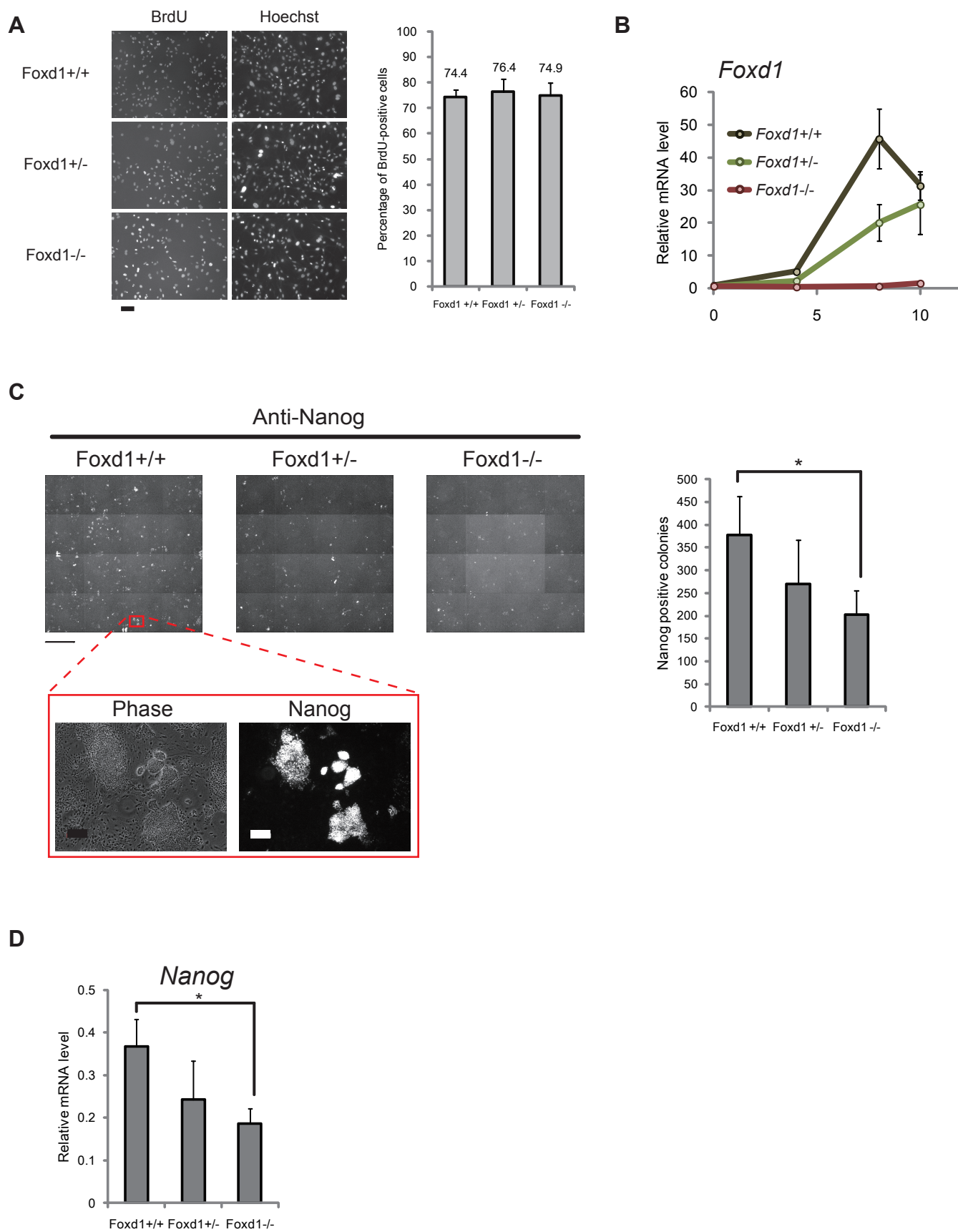


図 7 Foxd1 のノックアウトによるリプログラミング効率の減少

図7 Foxd1 のノックアウトによるリプログラミング効率の減少

3 種類の MEF(ワイルドタイプ MEF、Foxd1 ヘテロノックアウト MEF、Foxd1 ホモノックアウト MEF) を用いて実験を行っている。なお、グラフについて p-value はペア T 検定により算出した (* p < 0.05)。

(A) 3 種類の MEF における細胞増殖の比較。MEF において、3 種類の MEF(ワイルドタイプ MEF、Foxd1 ヘテロノックアウト MEF、Foxd1 ホモノックアウト MEF) に細胞増殖の違いはなかった。細胞は、12 時間 BrdU でラベルされた後、BrdU 抗体染色、ヘキスト染色を行った。全細胞 (ヘキスト陽性細胞) のうち BrdU 陽性細胞の割合を計測し比較を行った。グラフは独立 3 回の平均値 ± SEM を示している。Scale bar = 100 μm。

(B) Foxd1 の発現量の変化。MEF に 3 因子を感染させてリプログラミングを誘導した。グラフは独立 3 回の平均値 ± SEM を示している。ワイルドタイプ MEF、Foxd1 ヘテロノックアウト MEF、Foxd1 ホモノックアウト MEF と、ゲノム上の Foxd1 の遺伝子数に応じて Foxd1 の発現量が異なっている。

(C) iPS 細胞のコロニー計測。MEF は Day 10 から Day 15 にかけて固定され、Nanog 抗体染色を行った。低倍のレンズ (x1.25 レンズ) を用いて 6 well ディッシュ 1 well につき 4x4 の 16 枚の写真を撮影しモンタージュ画像を作製した。Scale bars = 4mm。得られた画像を基に iPS 細胞コロニー数を計測した。グラフは独立 5 回の平均値 ± SEM を示している。なお、赤く囲んだ領域をさらに高倍のレンズ (x10 レンズ) で撮影し、得られた画像をモンタージュ画像に併せて示している。Scale bars = 200 μm。

(D) Nanog の発現量の変化。MEF によって (すなわち Foxd1 の発現量の違いによって) リプログラミング効率の違いが生じた。qRT-PCR 解析は Day 8 に行った。グラフは独立 6 回の平均値 ± SEM を示している。

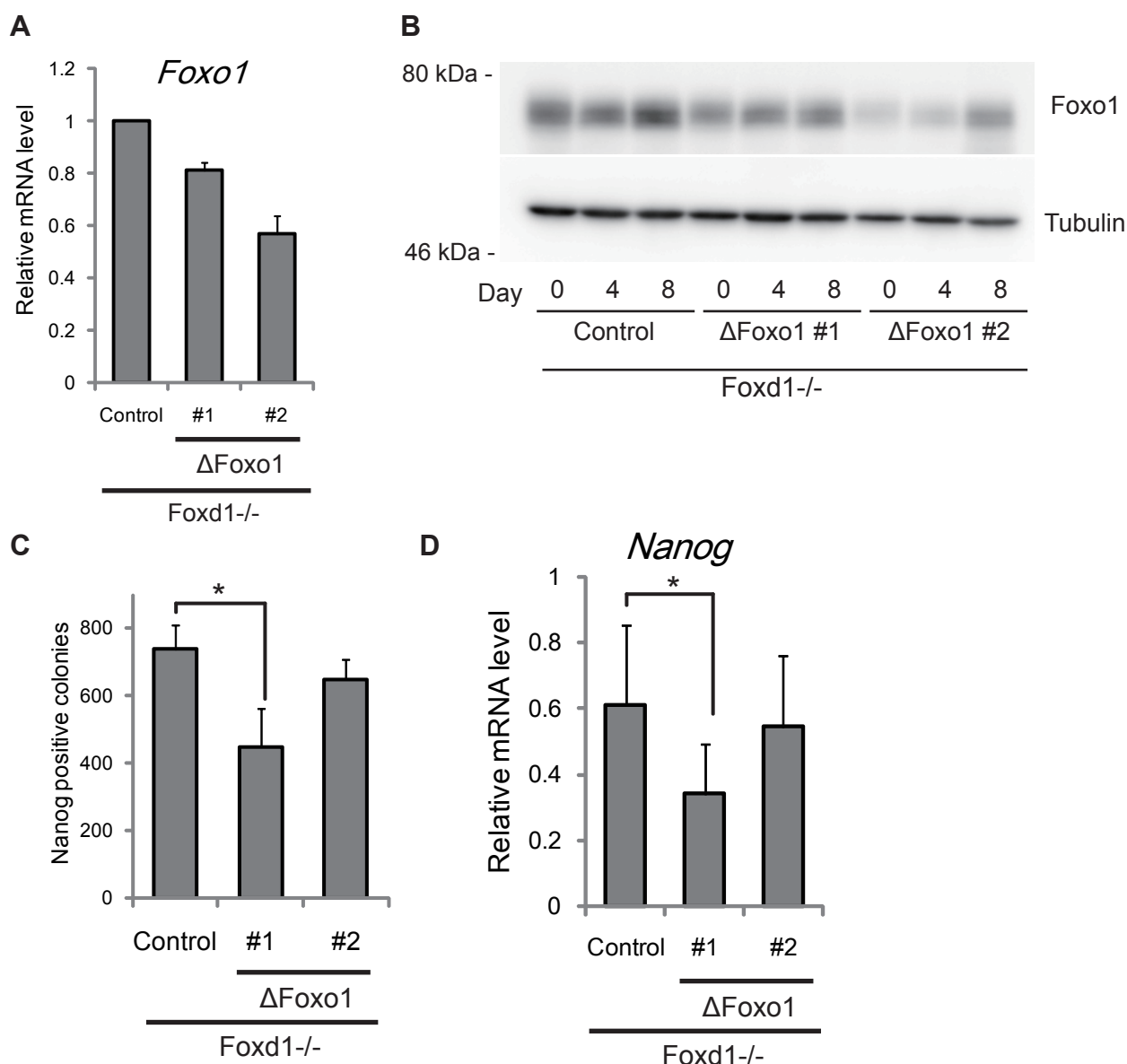


図8 Foxd1 ホモノックアウト MEF における Foxo1 発現抑制によるリプログラミング効率の減少

Foxd1 ホモノックアウト MEF に対して、コントロール shRNA、Foxo1 をターゲットとする shRNA2 種をレンチウイルスによって感染させ、3 日後に 3 因子のレトロウイルスを感染させてリプログラミングを誘導した。なお、グラフについて p-value はペア T 検定により算出した (* $p < 0.05$)。

(A-B) shRNA による Foxo1 の発現抑制の効果。qRT-PCR 解析、ウェスタンブロッティングにより mRNA レベル、タンパク質レベルでの発現減少が認められた。(A) qRT-PCR 解析は Day 4 に行った。独立 3 回の平均値 \pm SEM を示している。(B) Day 0, Day 4, Day 8 においてサンプルを回収しウェスタンブロッティングを行った。Tubulin をローディングコントロールとしている。

(C) iPS 細胞コロニー数の計測。shRNA による発現抑制により、iPS 細胞コロニー数が減少した。MEF は、Day 12 から Day 16 にかけて固定され Nanog 抗体染色を行った。グラフは独立 3 回の平均値 \pm SEM を示している。

(D) Nanog 発現量の定量。shRNA による発現抑制により、Nanog の発現量が減少している。qRT-PCR 解析は Day 8 に行った。グラフは独立 6 回の平均値 \pm SEM を示している。

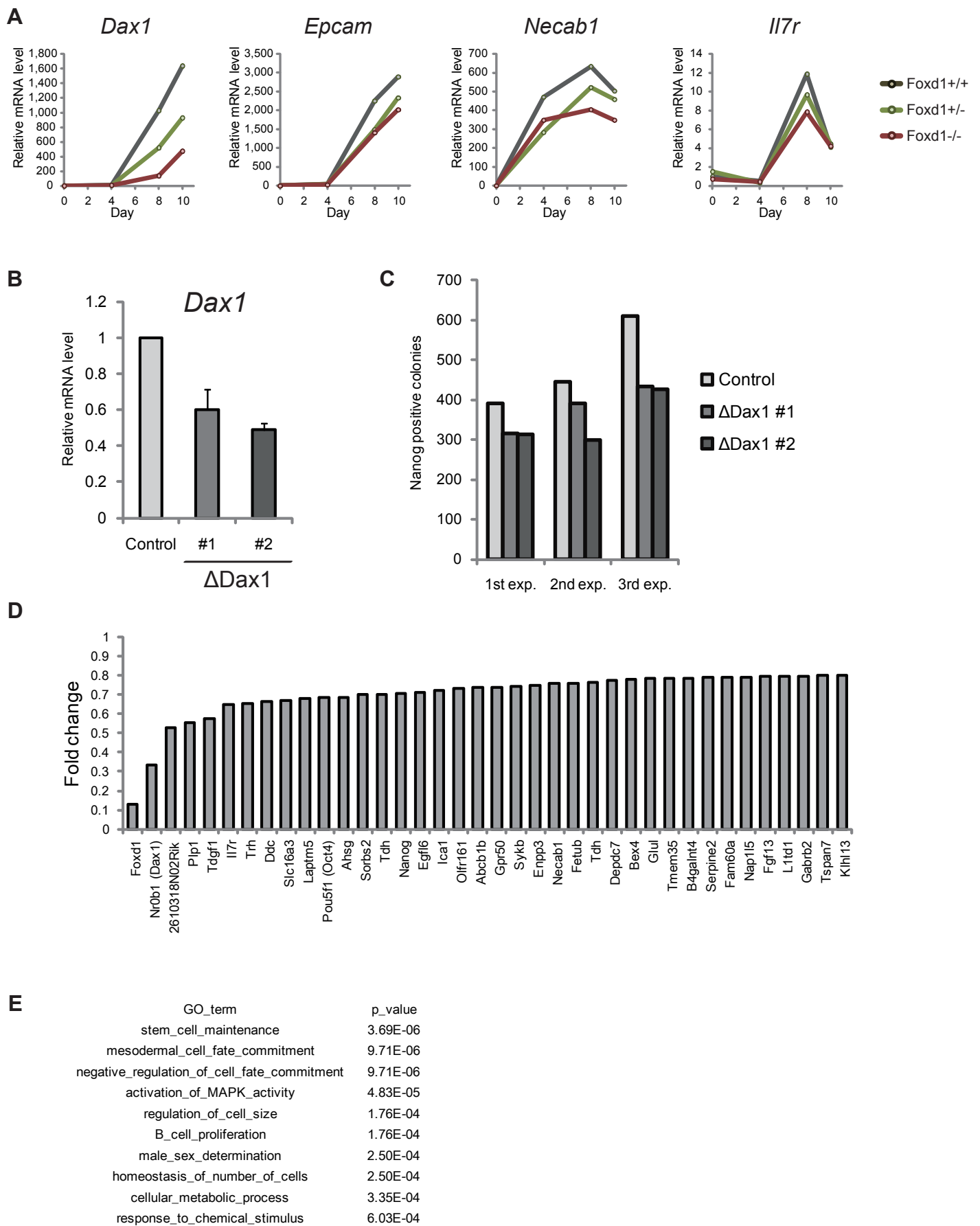


図9 Foxd1 のノックアウトによるリプログラミング関連遺伝子の発現の減少

図9 Foxd1 のノックアウトによるリプログラミング関連遺伝子の発現の減少

- (A) Foxd1 下流遺伝子の発現量の変化。3 種類の MEF (ワイルドタイプ MEF、Foxd1 ヘテロノックアウト MEF、Foxd1 ホモノックアウト MEF) に関してプロモーター領域に Foxd1 結合配列を持つ遺伝子 (Dax1、Epcam、Necab1、Il7r) の発現変化を比較した。Foxd1 の発現量に応じて、これらの遺伝子の発現量が上昇している。実験は 3 回行われ典型的な 1 回のデータを示している。
- (B) shRNA による Dax1 の発現抑制の効果。ワイルドタイプ MEF に対してコントロール shRNA、Dax1 をターゲットとする shRNA2 種をレンチウイルスによって感染させ、3 日後に 3 因子のレトロウイルスを感染させてリプログラミングを誘導した。qRT-PCR 解析は Day 8 に行った。グラフは独立 3 回の平均値 \pm SEM であり、コントロール shRNA に対する相対値を示している。
- (C) iPS 細胞コロニー数の計測。shRNA による Dax1 の発現抑制により、iPS 細胞コロニー数が減少した。MEF は Day 10 から Day 15 にかけて固定、Nanog 抗体染色がなされた。グラフは独立 3 回の結果を示している。
- (D) Fold change (ホモノックアウト MEF における発現量 / ワイルドタイプ MEF における発現量) < 0.8 の 38 遺伝子。ホモノックアウト MEF とワイルドタイプ MEF について比較を行ったマイクロアレイ解析を基に Fold change (ホモノックアウト MEF における発現量 / ワイルドタイプ MEF における発現量) を算出した。個々の遺伝子の発現量は表 2 に示している。
- (E) Fold change < 0.8 の 38 遺伝子における gene ontology 解析。p value の小さなもの上位 10 個の Gene ontology term を示している。

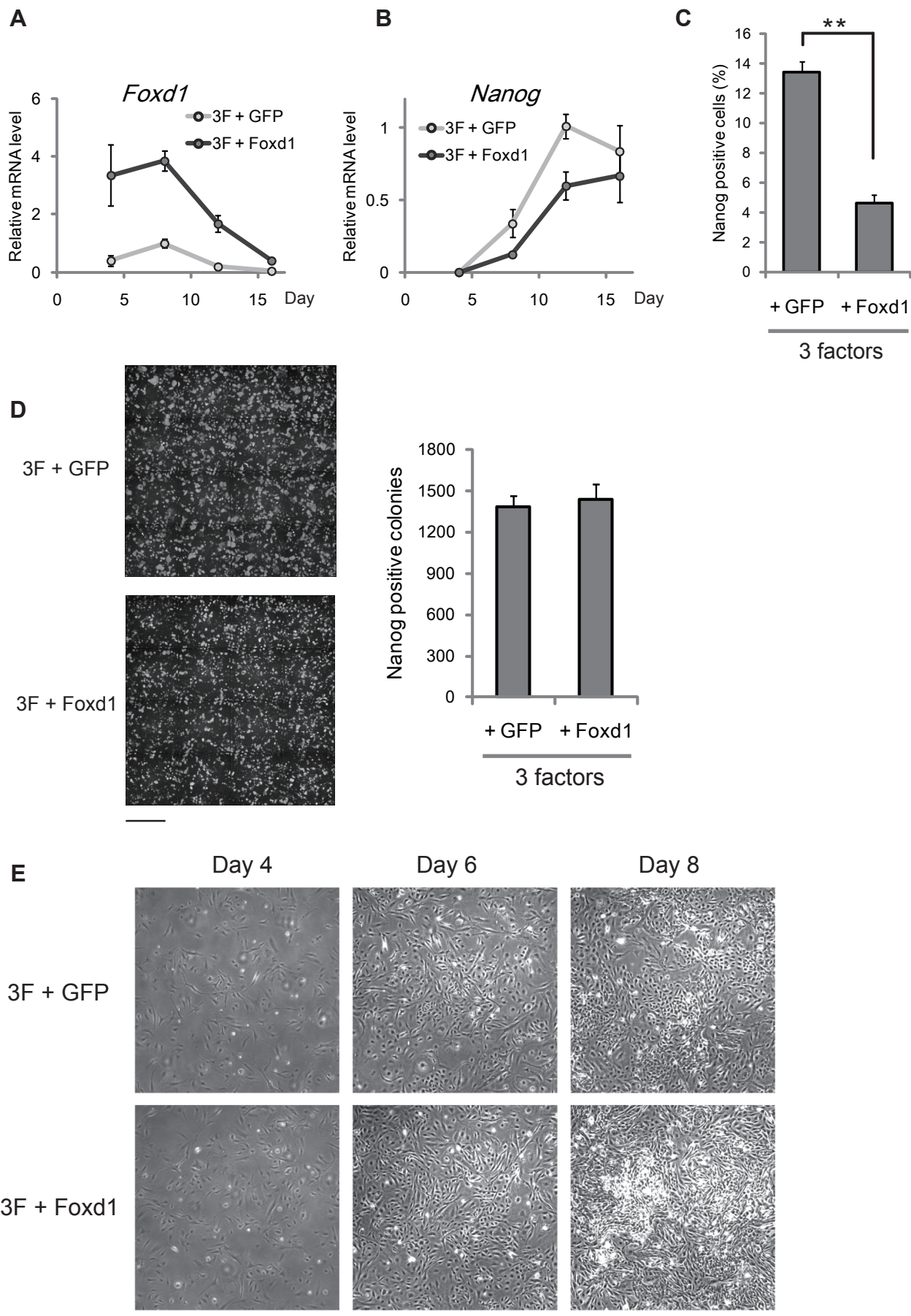


図 10 Foxd1 の過剰発現が与えるリプログラミングへの影響

図 10 Foxd1 の過剰発現が与えるリプログラミングへの影響

MEF に 3 因子と共に GFP もしくは Foxd1 を感染させ、リプログラミングに与える Foxd1 の影響を調べた。

(A) Foxd1 の発現量の変化。3F+Foxd1 では、Foxd1 の発現量が 3F+GFP に比べて約 4 倍に増加した。ここでは内在性の Foxd1 とウィルス由来の Foxd1 の区別はできない。グラフは独立 3 回の平均値 \pm SEM であり、3F+GFP Day 8 に対する相対値を示している。

(B) Nanog の発現量の変化。Foxd1 の過剰発現により、単位当たりの Nanog の発現量が減少している。グラフは独立 3 回の平均値 \pm SEM であり、3F+GFP Day 8 に対する相対値を示している。

(C) Nanog 発現細胞の割合の定量。Foxd1 の過剰発現により、全体の細胞に対する iPS 細胞の割合が減少した。MEF は Day 12 において固定、Nanog 抗体染色がなされた。グラフについて p-value はペア T 検定により算出した (** $p < 0.01$)

(D) iPS 細胞コロニー数の計測。3F+GFP と 3F+Foxd1 で有意な差は検出できなかった。MEF は Day 14 で固定、Nanog 抗体染色がなされた。4x4 のモザイク画像を取得後、画像に含まれる iPS 細胞コロニー数を数えた。Scale bar = 4mm。グラフは独立 3 回の平均値 \pm SEM を示している。

(E) リプログラミング過程の顕微鏡写真。3F+Foxd1 ではより増殖が速く細胞が密になっているように見える。Scale bar = 200 μ m。

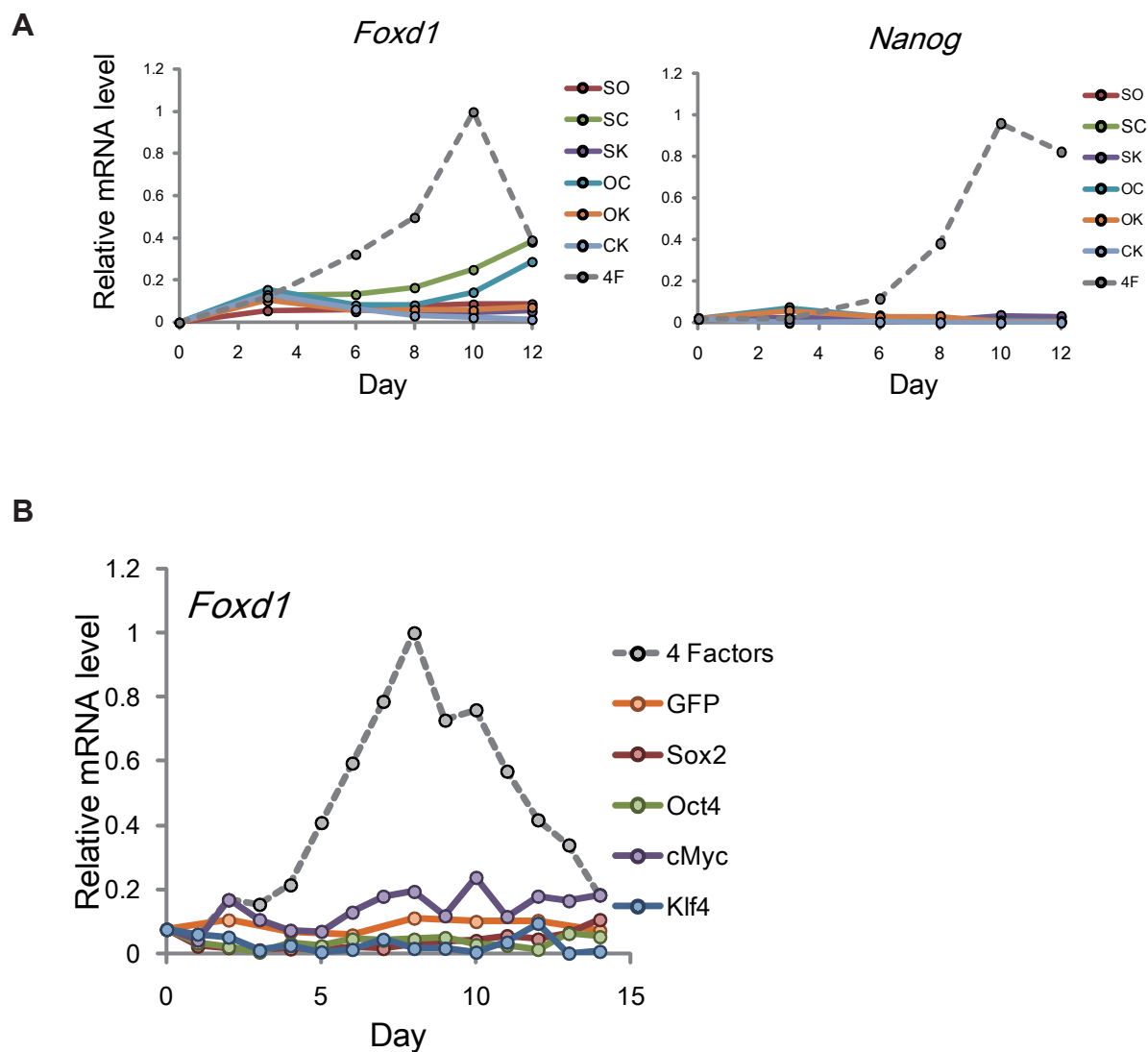


図 11 2 因子と 1 因子による *Foxd1* の発現量の変化

(A) 2 因子による *Foxd1* と *Nanog* の発現量の変化。MEF に 2 因子 (Sox2-Oct4、Sox2-cMyc、Sox2-Klf4、Oct4-cMyc、Oct4-Klf4、cMyc-Klf4 の 6 パターン) を発現させた場合、Sox2-cMyc、Oct4-cMyc でわずかに *Foxd1* の発現が上昇したが、残り 4 パターンではほとんど上昇しなかった。また、Sox2-cMyc、Oct4-cMyc 含むすべての 6 パターンにおいて *Nanog* の発現上昇は見られなかった。グラフは 4 因子による発現量の変化を併せて示しており、*Foxd1*、*Nanog* とともに 4F Day 10 に対する相対値を示している。

(B) 1 因子による *Foxd1* の発現量の変化。MEF に 1 因子 (Oct4、Sox2、Klf4、cMyc とコントロールとして GFP を含めた 5 パターン) を発現させた場合、いずれの場合も *Foxd1* の発現上昇は見られなかった。グラフは 4 因子による発現量の変化を併せて示しており、4F Day 8 に対する相対値を示している。

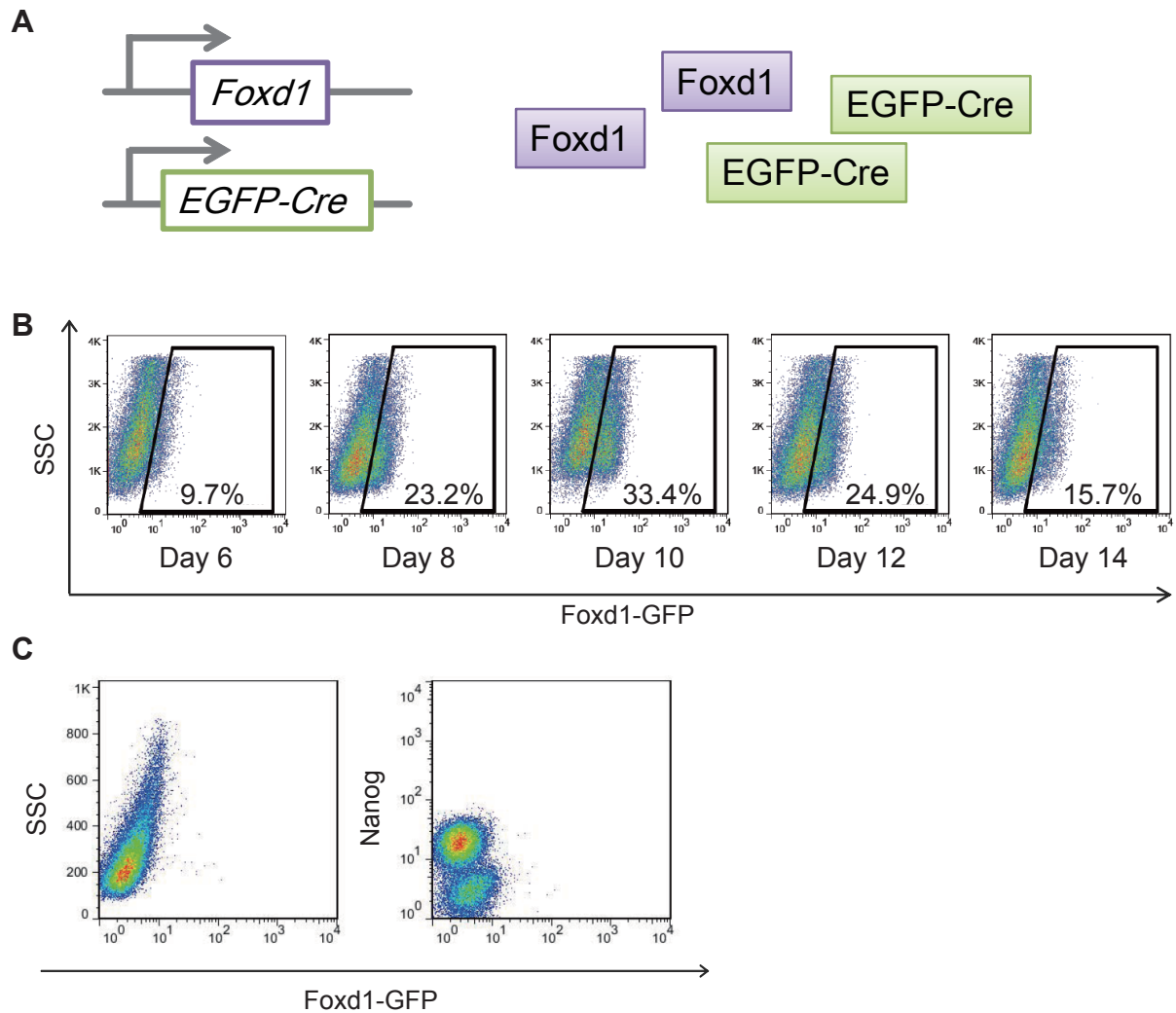


図 12 Foxd1 発現細胞の性質

(A) Foxd1 レポーター細胞の模式図。Foxd1 ヘテロノックアウト MEF は Foxd1 プロモーター制御下で EGFP-Cre を発現するため、Foxd1 発現細胞を GFP 発現細胞として検出できる。

(B) Foxd1 発現細胞の割合の変化。Foxd1 発現細胞を GFP 発現細胞として FACS 解析により検出した。ゲート内に含まれる細胞を Foxd1 発現細胞とし、その割合を示している。Foxd1 発現細胞は Day 10 頃に最大の割合となり、以降その割合は減少した。

(C) Foxd1 発現と Nanog 発現の相関。Nanog を発現する iPS 細胞は Foxd1 を発現しない。Foxd1 ヘテロノックアウト MEF は Day 40 において固定、Nanog 抗体染色がなされた。

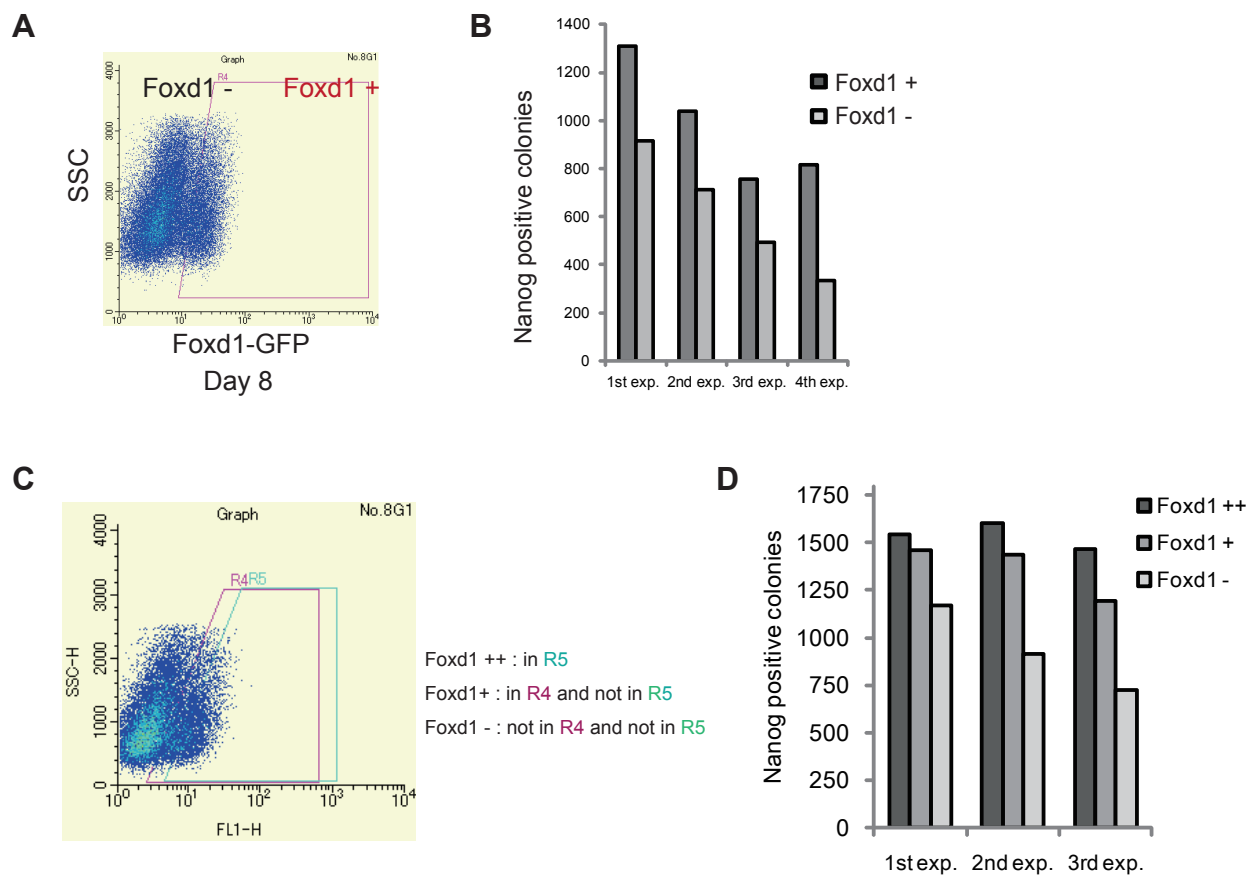


図 13 Foxd1 はリプログラミングの正しい進行を示す

セルソーターにより Foxd1 発現細胞と Foxd1 未発現細胞をそれぞれ分取し、feeder 細胞上に同じ細胞数ずつ播き直した。その後コロニーの出現を待って Nanog 抗体染色を行い、モンタージュ画像を取得し iPS 細胞コロニー数を計測した。

(A) Day 8 におけるセルソーティング。赤く囲まれた領域を Foxd1 発現細胞としてソートした。

(B) iPS 細胞コロニー数の計測。Foxd1 発現細胞からより多くの iPS 細胞コロニーが出現した。MEF は Day 18 から Day 22 にかけて固定、Nanog 抗体染色がなされた。グラフは独立 4 回の結果を示している。

(C) Day 8 におけるセルソーティング。Foxd1 発現細胞の中でより高い発現を持つ細胞を Foxd1 ++ (R5 ゲート内の細胞)、より低い細胞を Foxd1 + (R4 ゲート内かつ R5 ゲート外の細胞) とし、Foxd1 未発現細胞 (R4 ゲート外かつ R5 ゲート外の細胞) の 3 つの集団としてそれぞれ分取した。

(D) iPS 細胞コロニー数の計測。Foxd1 の発現が強い順に多くの iPS 細胞コロニーが出現した。MEF は Day 16 から Day 18 にかけて固定、Nanog 抗体染色がなされた。グラフは独立 3 回の結果を示している。

図 14

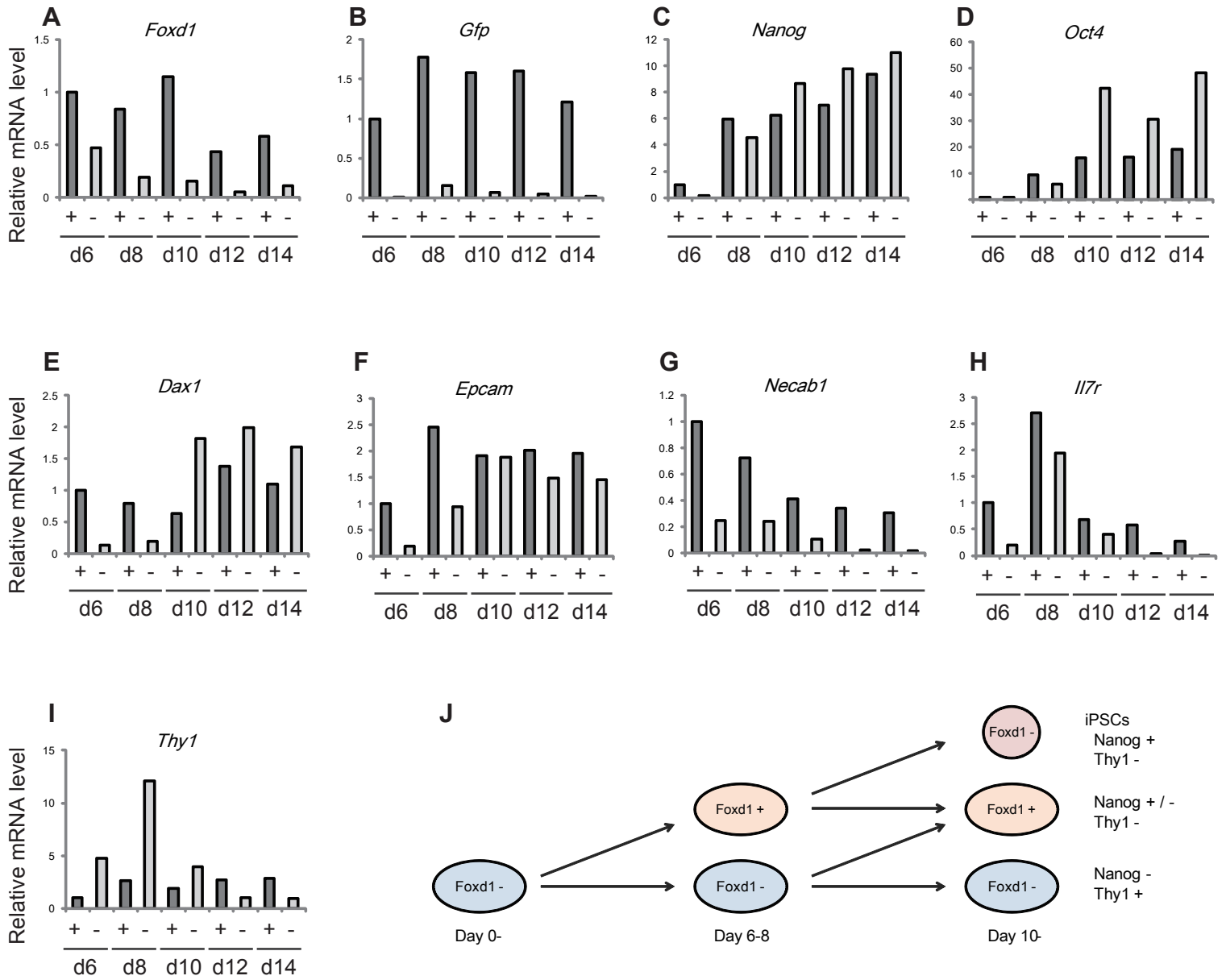


図 14 Foxd1 の発現有無による遺伝子発現の違い

図 14 Foxd1 の発現の有無による遺伝子発現の違い

Foxd1 ヘテロノックアウト MEF は Day 6、Day 8、Day 10、Day 12、Day 14 で Foxd1 発現細胞 (「+」) と Foxd1 未発現細胞 (「-」) の 2 つの集団に分取され、qRT-PCR 解析を行った。グラフはそれぞれ Day 6 Foxd1 発現細胞に対する相対値を示している。

(A-B) Foxd1 と Gfp の発現量。適切にソートされていることを Foxd1(A) と Gfp(B) の発現により確認した。

(C-D) 多能性マーカーである Nanog と Oct4 の発現量。Nanog(C) と Oct4(D) とともに Day 6-8 では Foxd1 発現細胞により高い発現を示しているが、それ以降の時期 (Day 10-14) では Foxd1 未発現細胞により高い発現を示した。なお、Nanog に比べて Oct4 は、Day 6-8 における発現量の差は小さく (Foxd1 発現細胞と Foxd1 未発現細胞が近い値をとっている)、Day 10-14 における差は大きい (Foxd1 発現細胞に比べて Foxd1 未発現細胞がより高い値をとっている) 傾向にある。

(E-H) プロモーター領域に Foxd1 結合配列を持つ遺伝子 (Dax1、Epcam、Necab1、Il7r) の発現量。Dax1(E) は Nanog や Oct4 と同じ傾向を示している。すなわち、Day 6-8 では Foxd1 発現細胞により高い発現を示しているが、それ以降の時期 (Day 10-14) では Foxd1 未発現細胞により高い発現を示した。また、Day 6-8 においては Nanog や Oct4 以上に大きな発現量の差 (Foxd1 発現細胞 > Foxd1 未発現細胞) がある。Epcam (F)、Necab1(G)、Il7r(H) はいずれの時点でも Foxd1 発現細胞がより高い発現を示した。

(I) 体細胞マーカーである Thy1 の発現量。MEF を含めて体細胞で高い発現を持つ Thy1 の挙動は、Nanog や Oct4 と逆の発現を示した。すなわち、Day 6-10 では Foxd1 未発現細胞により高い発現を示しているが、それ以降の時期 (Day 12-14) では Foxd1 発現細胞により高い発現を示した。

(J) Foxd1 発現細胞の推移を示す模式図。リプログラミングの開始時点である MEF では Foxd1 の発現はなく、体細胞マーカーである Thy1 が発現している。3 因子や 4 因子により Foxd1 の発現が上昇し始めた頃 (Day 6-8)、Foxd1 発現細胞において Thy1 の発現が減少し、かつ多能性マーカーである Nanog の発現が上昇し始める。さらに時間が進むと、Foxd1 を一過的に発現しその後に発現が減少した細胞と、最初からずっと Foxd1 を発現していない細胞の 2 種類の Foxd1 未発現細胞が存在するようになる。このうち前者は iPS 細胞であり Thy1 の発現は低く、Nanog の発現は高い。後者は Thy1 の発現が維持され、Nanog は未発現の状態のままとなっている。

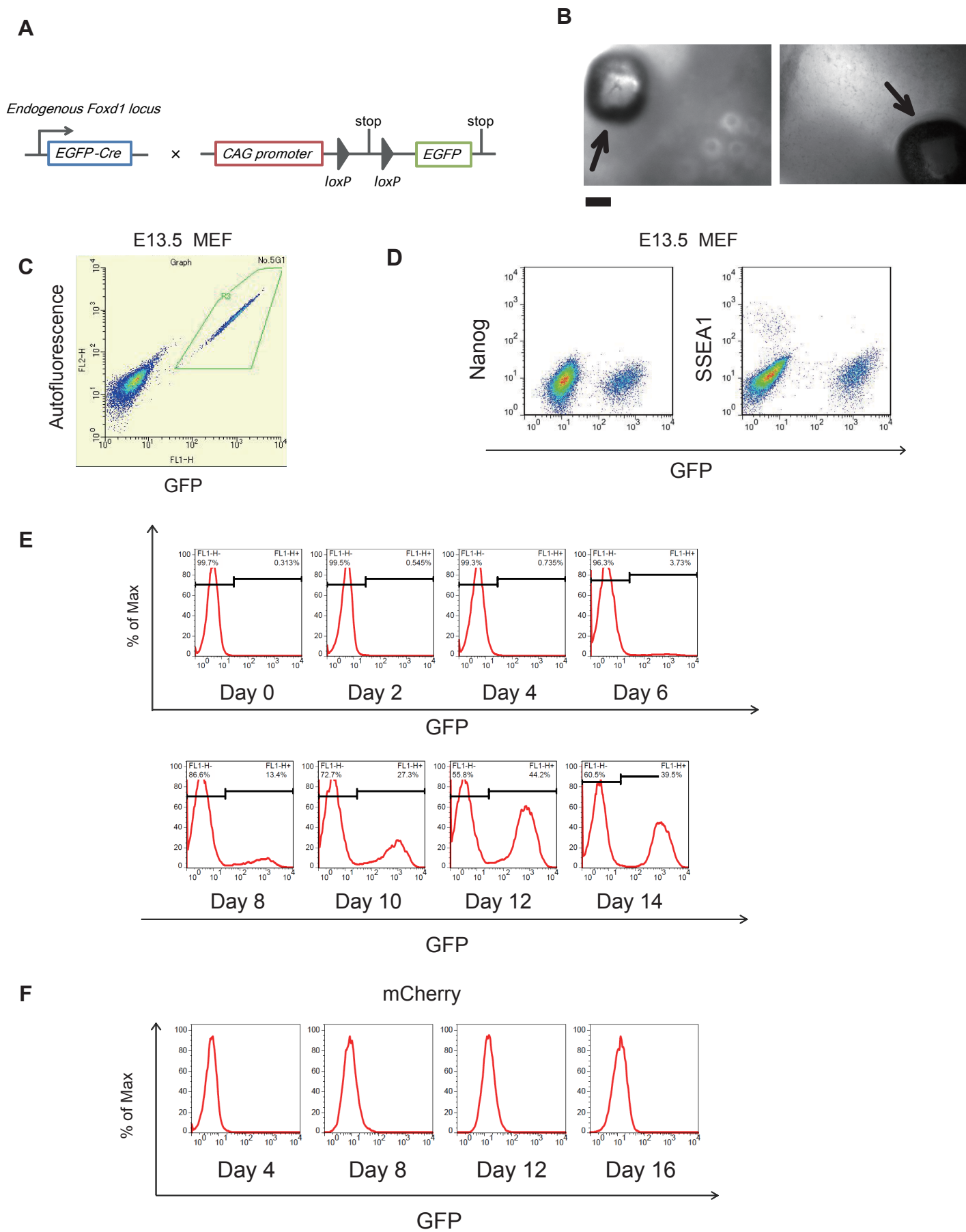


図 15 Cre-LoxP システムを用いた *Foxd1* 発現細胞の運命追跡

図 15 Cre-LoxP システムを用いた Foxd1 発現細胞の運命追跡

- (A) Foxd1-GFP-Cre マウスと CAG-GFP マウスを掛け合わせ細胞運命追跡用 MEF を作成した。この MEF は、Foxd1 プロモーター制御下で発現する EGFP-Cre が部位特異的組換えを起こし、以後恒常的に CAG プロモーター制御下で EGFP を発現する。
- (B) E13.5 胎児の写真。E13.5 の時点で Foxd1 の発現経験により GFP が強く発現している組織が見られる。矢印は胎児の目を示している。Scale bar = 400 μ m。
- (C) MEF における FACS 解析。MEF の状態 (すなわちリプログラミング誘導以前の状態) で、すでに GFP 発現細胞が存在していた。リプログラミングの誘導はこれらの細胞 (緑で囲まれた領域) をセルソーターにより除いた状態で行った。
- (D) MEF における Foxd1 発現経験と Nanog の発現、SSEA1 の発現との相関。MEF の時点で Foxd1 の発現を経験している細胞 (GFP 発現細胞) と Foxd1 の発現を経験していない細胞 (GFP 未発現細胞) は、Nanog 発現、SSEA1 発現において差がない。
- (E) リプログラミング誘導における Foxd1 発現経験細胞割合の変化。Foxd1 発現経験細胞は、Day 6 頃より出現しはじめ Day12-14 頃最大となる 30-40 パーセントを占めた。以降 30 パーセント以上の高い値をとり続けた。
- (F) mCherry 発現における Foxd1 発現経験細胞割合の変化。mCherry の発現では部位特異的組換えは起こらず、GFP を発現する細胞は出現しない。

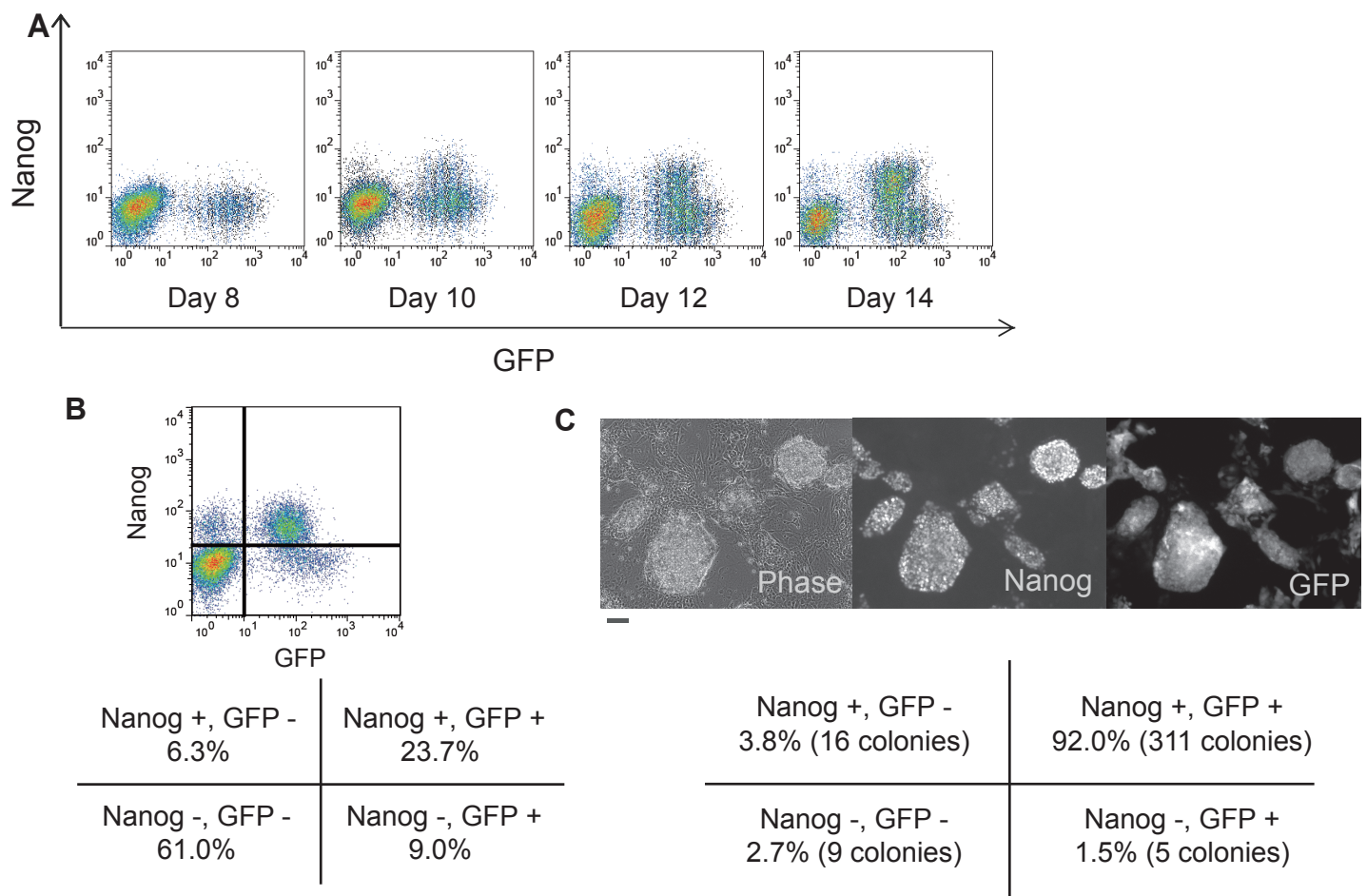


図 16 iPS 細胞の多くは Foxd1 発現細胞より生まれる

Foxd1-GFP-Cre マウスと CAG-GFP マウスを掛け合わせて作成された細胞運命追跡用 MEF を用いて実験を行った。MEF の性質については図 15 に示している。

(A) Foxd1 発現経験と Nanog 発現の相関。Day 8 頃、Foxd1 発現経験細胞は存在するも Nanog 発現細胞は存在しない。時間の経過とともに Foxd1 発現経験細胞は割合を増す。同時に Nanog 発現細胞が Foxd1 発現経験細胞より出現する。

(B) Foxd1 発現経験と Nanog 発現の相関の定量。Foxd1 発現経験と Nanog 発現の有無によって 4 つに分けられた集団の割合を示す。Nanog 発現細胞のうち 79.0 パーセント (GFP + / Nanog + = 23.7% / 30.0%) が Foxd1 の発現を経験している。Day 25 に行った FACS 解析を基にしている。

(C) iPS 細胞のコロニー計測。Nanog を発現した iPS 細胞コロニーのうち 95.1 パーセント (GFP + / Nanog + = 311 個 / 327 個) が Foxd1 の発現を経験している。Day 16 に行った Nanog 抗体染色を基にしている。

Scale bar = 200 μ m。

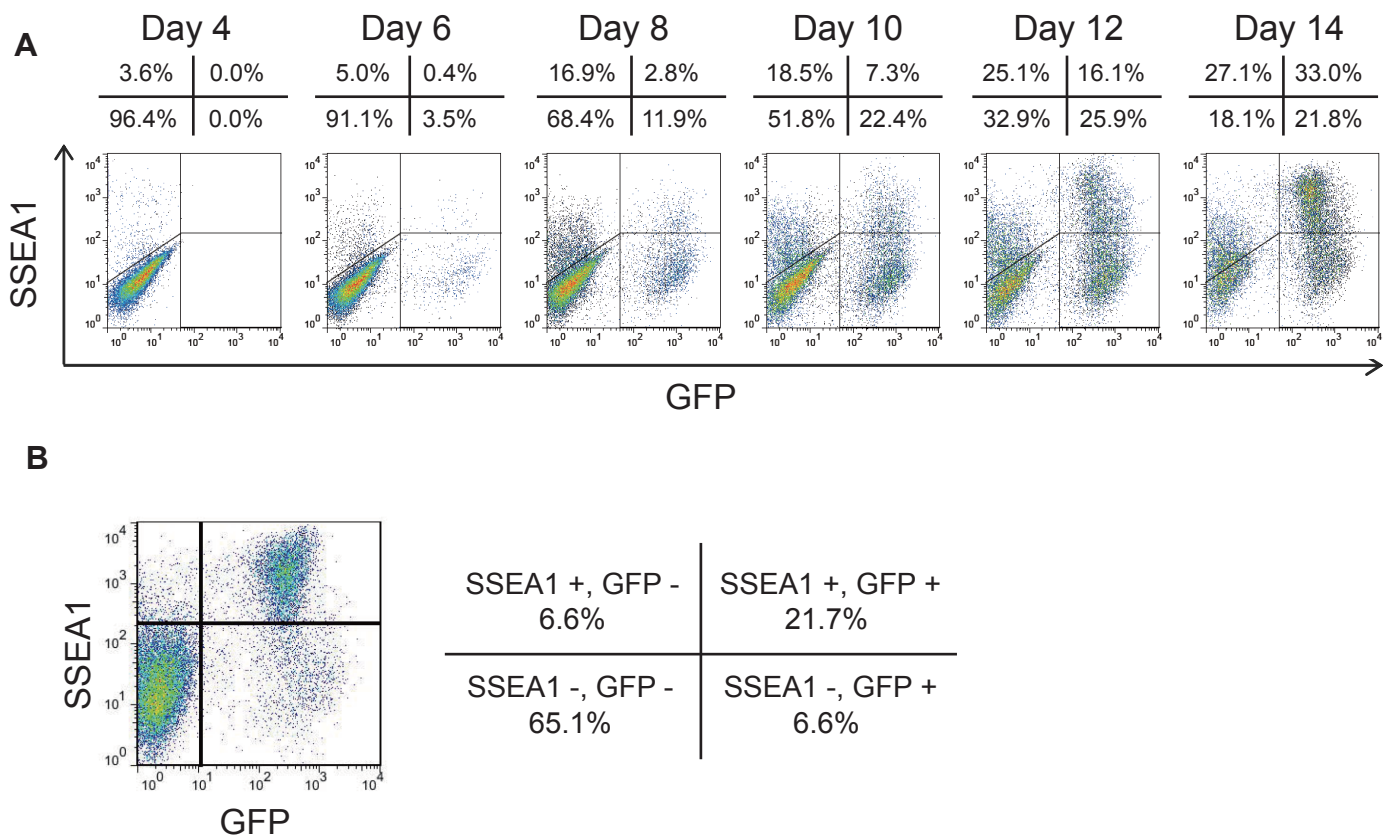


図 17 Foxd1 発現経験と SSEA1 発現の相関

Foxd1-GFP-Cre マウスと CAG-GFP マウスを掛け合わせて作成された細胞運命追跡用 MEF を用いて実験を行った。MEF の性質については図 15 に示している。

(A) Foxd1 発現経験と SSEA1 発現の相関。Foxd1 発現経験と SSEA1 発現の間に、Foxd1 発現経験と Nanog ほどの相関はなかった。しかし、時間の経過とともにその相関は強くなった。なお、SSEA1 は Foxd1 に比べて早いタイミングで発現を示した。

(B) Foxd1 発現経験と SSEA1 発現の相関の定量。Foxd1 発現経験と SSEA1 発現の有無によって 4 つに分けられた集団の割合を示す。SSEA1 を発現した iPS 細胞コロニーのうち 76.7 パーセント (GFP + / SSEA1 + = 21.7% / 28.3%) が Foxd1 の発現を経験している。Day 25 に行った FACS 解析を基にしている。

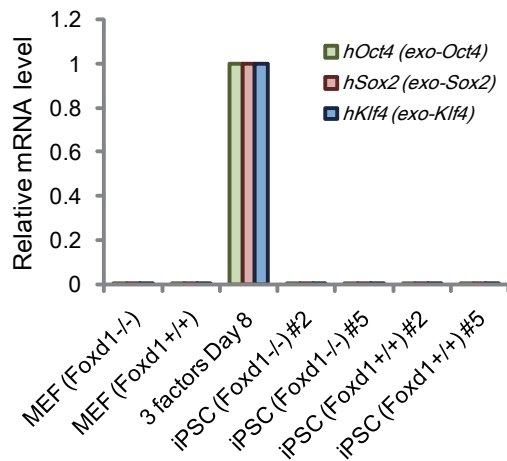


図 18 ウィルス由来の外来遺伝子のサイレンシング

ホモノックアウト iPS 細胞 2 ライン、ワイルドタイプ iPS 細胞 2 ラインの計 4 ラインの iPS 細胞について、ウィルス由来の遺伝子発現のサイレンシングを qRT-PCR 解析により調べた。ウィルス未感染の MEF についても併せて実験を行っている。すべての iPS 細胞ラインでウィルス由来の外来遺伝子のサイレンシングが起こっている。なお、本解析ではプライマーにより内在性 (mouse 由来) の発現とウィルス由来 (human 由来) の発現を区別することができる (図 2E)。グラフは 3F Day 8 に対する相対値が示されている。

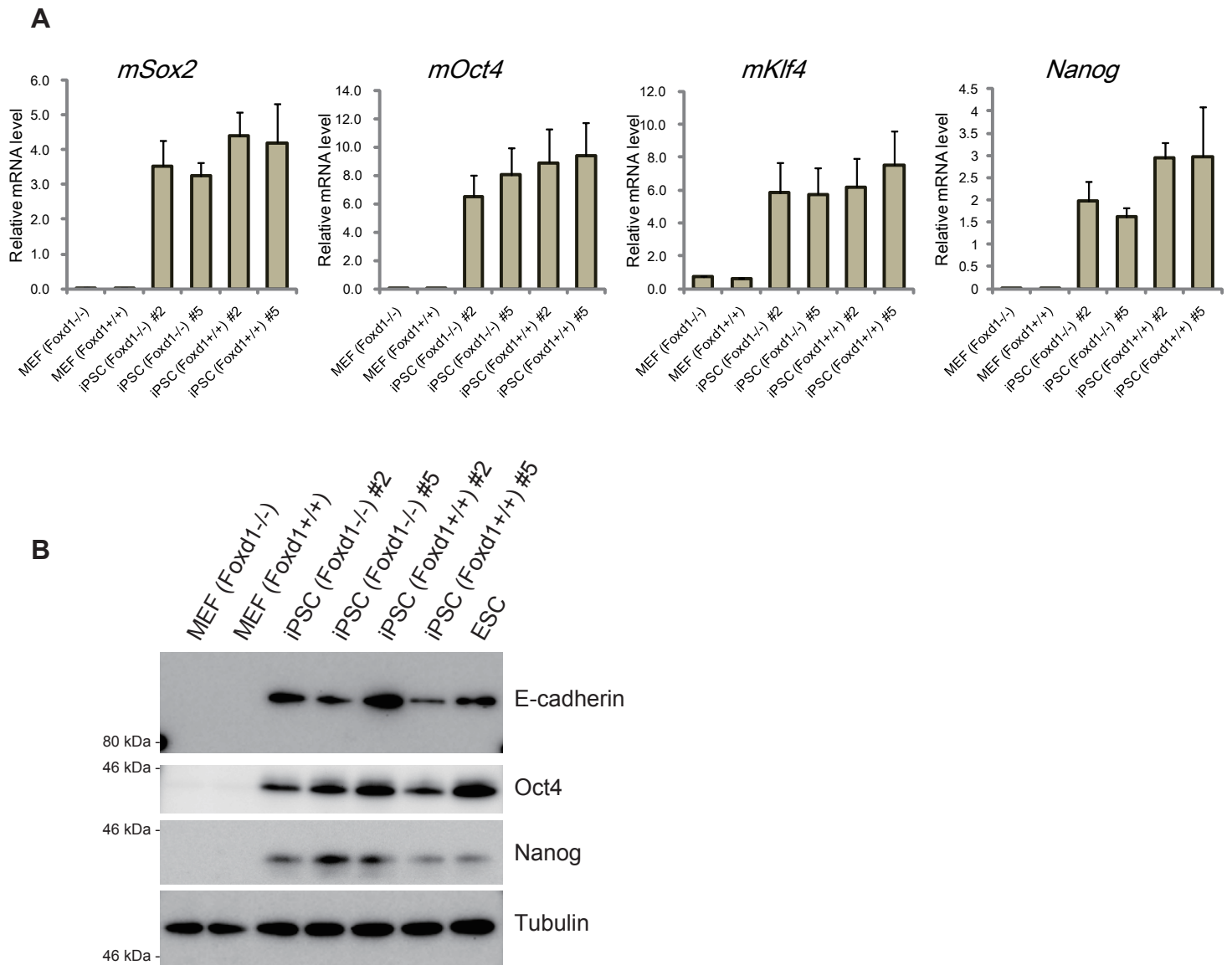


図 19 内在性の多能性マーカー (Sox2、Oct4、Klf4、Nanog、E-cad) の発現

Sox2、Oct4、Klf4、Nanog は qRT-PCR 解析 (A) によって、E-cadherin、Oct4、Nanog はウェスタンブロッティング (B) によって、その発現を調べた。iPS 細胞ライン間の発現レベルに差は検出できなかった。qRT-PCR 解析について、グラフは独立 3 回の平均値 \pm SEM であり、iPS 細胞 (iPS-MEF-Ng-20D-17) に対する相対値を示している。ウェスタンブロッティングについて、Tubulin をローディングコントロールとしている。

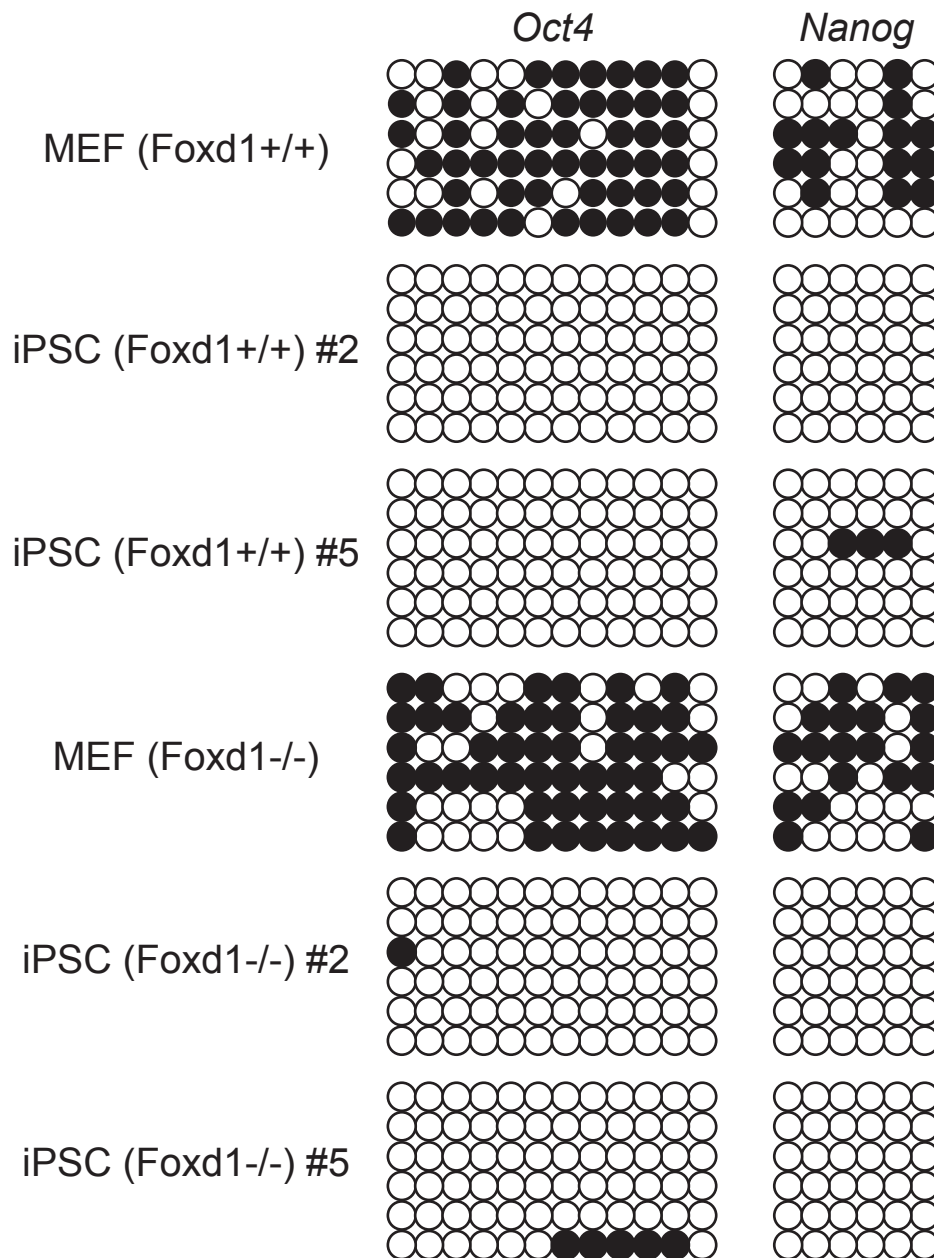


図 20 多能性マーカー (Oct4、Nanog) プロモーター領域の DNA メチル化状態

Oct4 プロモーターと Nanog プロモーターの DNA メチル化は、バイサルファイトシーケンス法を用いて検出された。黒丸はメチル化された CpG 領域を、白丸は脱メチル化された CpG 領域を示している。すべての iPSC 細胞ラインは脱メチル化傾向を示しており、MEF はメチル化傾向を示している。メチル化レベルに関して、iPS 細胞ライン間に差は見られなかった。

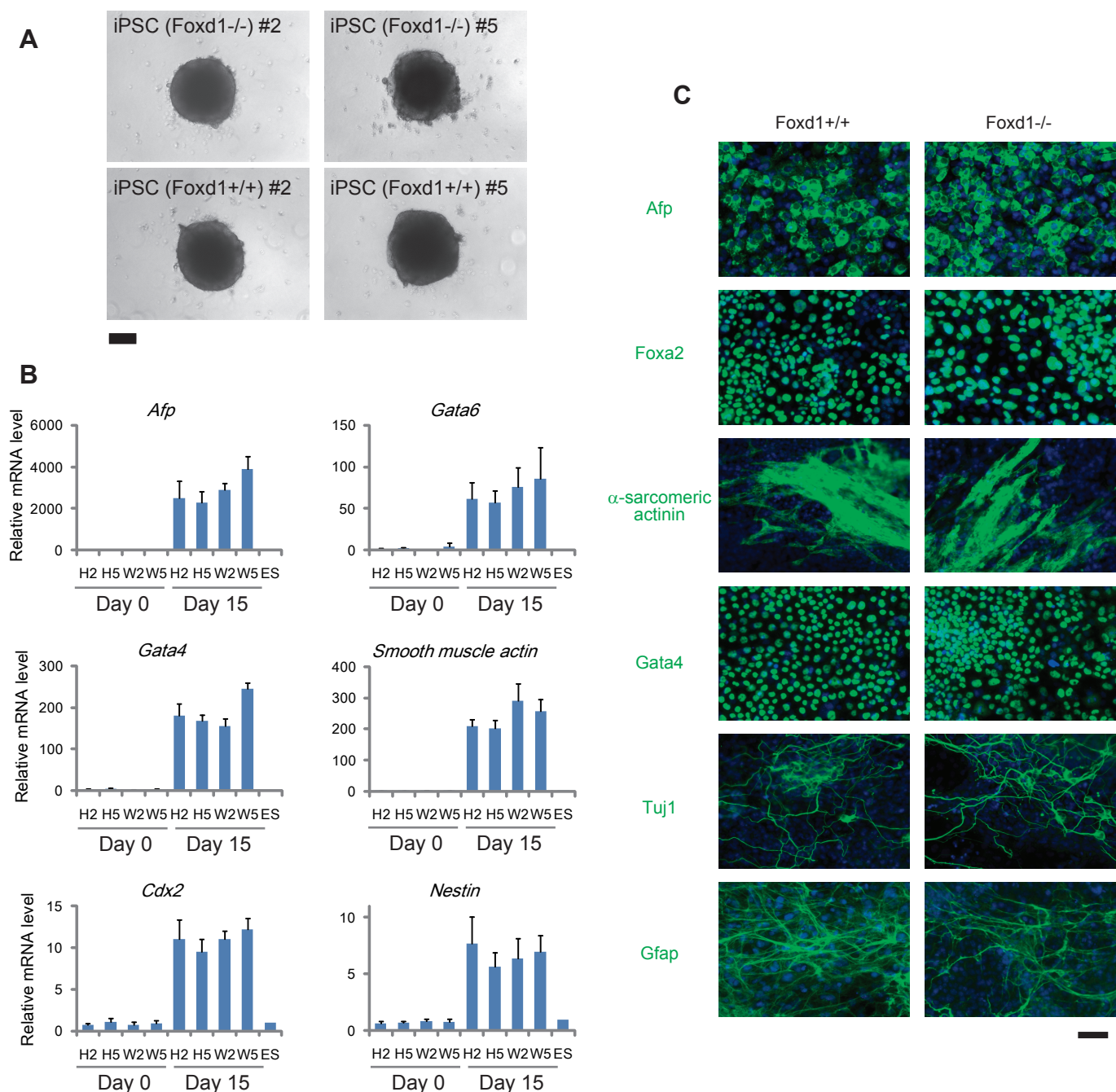


図 21 胚様体形成による in vitro 分化誘導における三胚葉系への分化の評価

(A) 胚様体の顕微鏡写真。胚様体は 5 日間の浮遊培養により形成された。Scale bar = 200 μ m。

(B) 分化マーカーの発現量の変化。胚様体形成後、接着培養を 10 日間行い分化誘導を行った。Afp と Gata6 は内胚葉、Gata4 と Smooth muscle actin は中胚葉、Cdx2 と Nestin は外胚葉のマーカーである。「H」は Foxd1 ホモノックアウト iPS 細胞を、「W」はワイルドタイプ iPS 細胞を示す。分化マーカーは分化誘導後高い発現を示しているが、iPS 細胞ライン間での発現レベルの差は検出できなかった。グラフは独立 4 回の平均値 \pm SEM であり、未分化状態にある ES 細胞における発現量に対する相対値を示している。

(C) 分化マーカーの発現。胚様体形成の後接着培養を 10 日間行い、種々の分化マーカー抗体で染色を行った。Afp、Foxa2 は内胚葉、 α -sarcomeric actinin、Gata4 は中胚葉、Tuj1、Gfap は外胚葉のマーカーである。またいずれの場合も同時に Hoechst で核の染色を行っている。iPS 細胞ライン間に差は見られなかった。

Scale bar = 50 μ m。

図 22

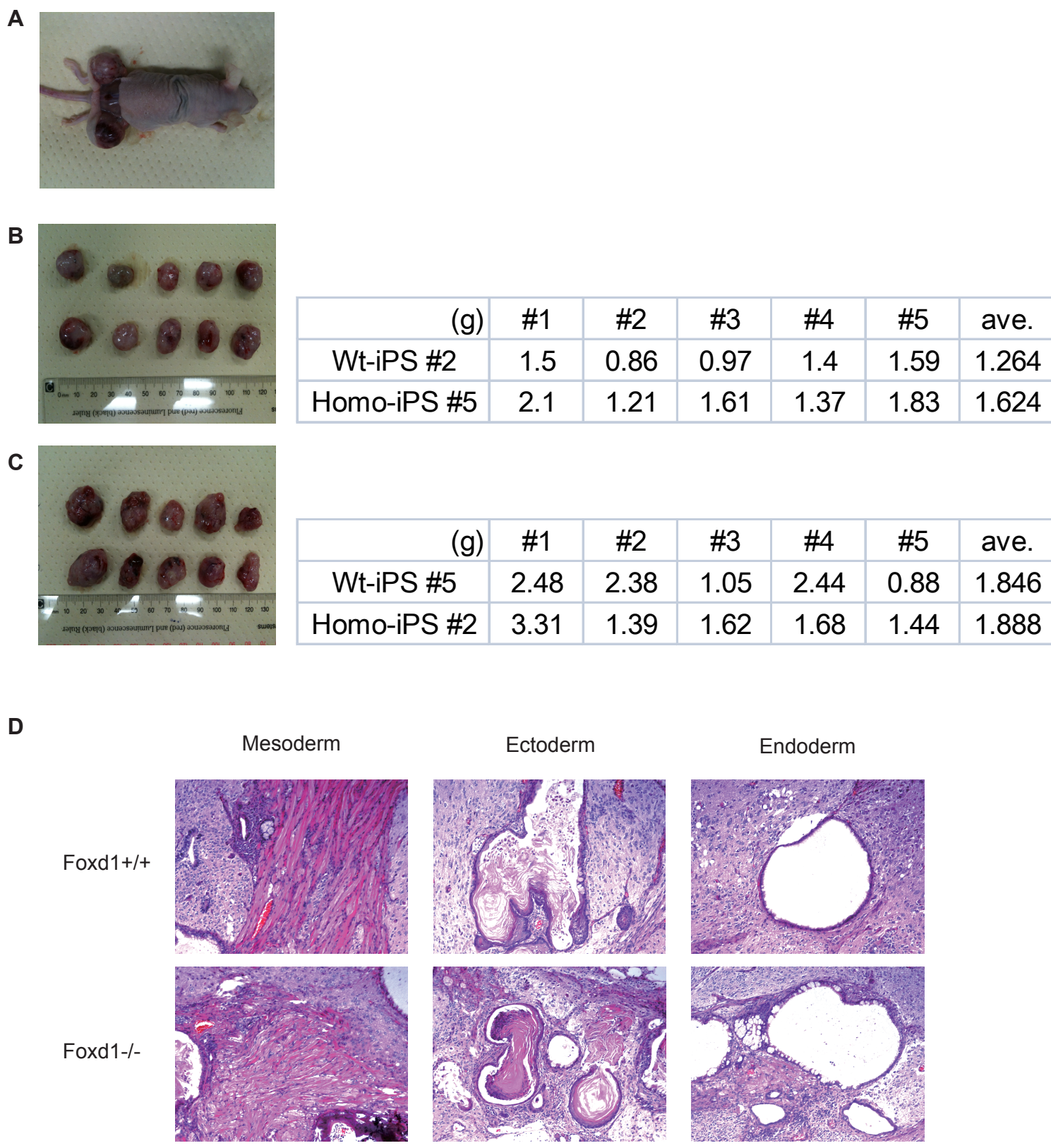


図 22 テラトーマ形成による in vivo 分化誘導における三胚葉系への分化の評価

図 22 テラトーマ形成による in vivo 分化誘導における三胚葉系への分化の評価

iPS 細胞を 10 週齢 Balb/c -nu/nu 雌マウスに注射後 5 週間後に解剖を行った。1 ラインにつき 5 か所、計 20 か所の注射を、10 個体 1 匹につき左右 2 か所に行った。左右の違いをなくするため 5 個体に左 Foxd1 ホモノックアウト iPS 細胞、右ワイルドタイプ iPS 細胞とし、残り 5 個体に左右を逆転させて注射している。

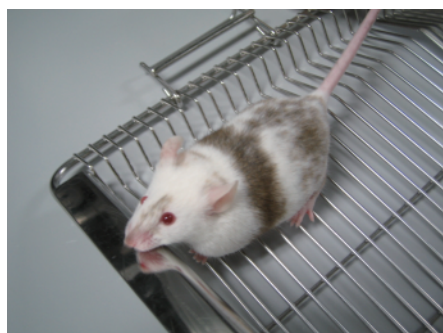
(A) マウスの解剖とテラトーマの摘出。左右 2 か所に iPS 細胞の注射を受けた 5 週間後、マウスを解剖しテラトーマを摘出した。

(B) 5 個体、左右 2 か所、計 10 個のテラトーマ。Foxd1 ホモノックアウト iPS 細胞 #5 がワイルドタイプ iPS 細胞 #2 より大きなテラトーマを形成していた。

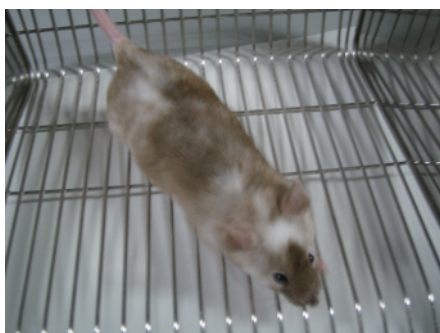
(C) (B) とは異なる 5 個体、計 10 個のテラトーマ。Foxd1 ホモノックアウト iPS 細胞 #2 とワイルドタイプ iPS 細胞 #5 の差は見られなかった。

(D) HE 染色画像。テラトーマは固定された後パラフィン包埋され HE 染色された。それぞれの胚葉特異的な組織が形成されている。iPS 細胞ライン間に差は見られなかった。Scale bar = 200 μ m。

Foxd1+/+ #2



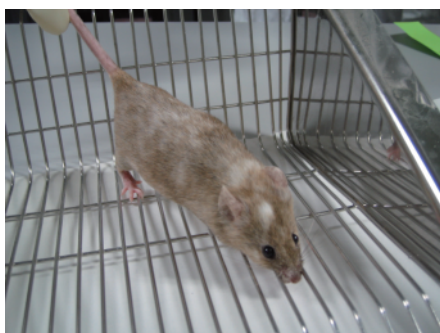
Foxd1+/+ #5



Foxd1-/- #2



Foxd1-/- #5



n = 110	Foxd1-/- #2	Foxd1-/- #5	Foxd1+/+ #2	Foxd1+/+ #5
70%		4 (♂3♀1)		3 (♂2♀1)
40%	2 (♂1♀1)		1 (♂1)	6 (♂5♀1)
10%	6 (♂5♀1)	4 (♂2♀2)	14 (♂13♀1)	8 (♂5♀3)
0%	59 (♂48♀11)	20 (♂7♀13)	54 (♂35♀19)	26 (♂21♀5)

図 23 キメラマウスの作製

ホモノックアウト iPS 細胞 2 ライン、ワイルドタイプ iPS 細胞 2 ラインの計 4 ラインの iPS 細胞は、ICR マウス胚盤胞に注入され偽妊娠の雌マウスに移植された。すべての iPS 細胞ラインからキメラマウスが生まれた。iPS 細胞は C57BL/6 マウス由来であり毛色は茶色、ホストの ICR マウスは毛色は白色である。毛色の違いから iPS 細胞の寄与率が判断された。写真のマウスは 10 週齢である。iPS 細胞ライン間について差は見られなかった。

表 1(1/4)

ProbeSetID	Gene_Symbol
10422962	1110020G09Rik
10378271	1200014J11Rik
10345921	1500015O10Rik
10481272	1700007K13Rik
10354529	1700019D03Rik
10460102	1700034H14Rik
10351465	1700084C01Rik
10524082	2310001H12Rik
10570002	2410089E03Rik
10405727	2410127L17Rik
10412481	2410127L17Rik
10461921	2410127L17Rik
10595205	2410127L17Rik
10455967	2610318N02Rik
10440077	2610528E23Rik
10350848	2810025M15Rik
10400896	2810055F11Rik
10519607	4930420K17Rik
10503593	6230409E13Rik
10527649	6330406I15Rik
10409990	6720489N17Rik
10421697	9030625A04Rik
10377534	A030009H04Rik
10512949	Abca1
10519555	Abcb1b
10355742	Abcb6
10606217	Abcb7
10456699	Acaa2
10355246	Acadl
10397148	Acot1
10494551	Acp6
10593723	Acsbg1
10477649	Acss2
10528038	Adam22
10587748	Adamts7
10505717	Adamts1
10505734	Adamts1
10535065	Adap1
10516529	Adc
10463911	Add3
10496425	Adh7
10344725	Adhfe1
10547386	Adipor2
10441740	Agpat4
10599001	Agtr2
10518455	Agtrap
10434689	Ahsg
10512999	AI427809
10512251	AI464131
10351867	Aim2
10466925	Ak3
10472923	Ak4
10506269	Ak4
10368356	Akap7
10543859	Akr1b3
10407435	Akr1c18
10376765	Aldh3a1
10401473	Aldh6a1
10351414	Aldh9a1
10379153	Aldoc

ProbeSetID	Gene_Symbol
10602223	Alg13
10517587	Alpl
10607116	Ammecr1
10403796	Amph
10428376	Angpt1
10450038	Angptl4
10501971	Ank2
10578515	Ankrd37
10569618	Ano1
10485718	Ano3
10485745	Ano3
10586064	Anp32a
10494322	Anp32e
10545974	Antr1
10578857	Anxa10
10403871	Aoah
10346410	Aox3
10355967	Ap1s3
10553917	Apba2
10456184	Apcdd1
10547621	Apobec1
10425321	Apobec3
10439009	Apod
10565627	Aqp11
10512156	Aqp3
10555470	Arap1
10530100	Arap2
10599562	Arhgap36
10447108	Arhgef33
10400057	Arl4a
10601771	Armxc1
10601768	Armxc4
10463704	As3mt
10465844	Asrgl1
10363541	Ass1
10471154	Ass1
10454235	Asxl3
10522335	Atp10d
10378216	Atp2a3
10538082	Atp6v0e2
10530319	Atp8a1
10489985	Atp9a
10366774	Avil
10592420	AW551984
10558773	B4galnt4
10353632	Bai3
10400357	Baz1a
10350853	BC026585
10445558	BC048355
10498710	Bche
10374727	Bcl11a
10560685	Bcl3
10606868	Bex1
10358457	Bex4
10601850	Bex4
10414269	Bnip3
10568785	Bnip3
10391461	Brca1
10606393	Brwd3
10461237	Bscl2

ProbeSetID	Gene_Symbol
10370920	Btbd2
10435982	Btla
10383025	C1qtnf1
10541683	C1rb
10547740	C1s
10586118	Calml4
10565689	Capn5
10586591	Car12
10457106	Cbln2
10363312	Ccdc138
10484197	Ccdc141
10484201	Ccdc141
10484203	Ccdc141
10484207	Ccdc141
10379535	Ccl8
10419465	Ccnb1ip1
10587383	Cd109
10499160	Cd1d1
10352905	Cd34
10593015	Cd3g
10368762	Cdc40
10472916	Cdca7
10575052	Cdh1
10423243	Cdh10
10348999	Cdh20
10349184	Cdh7
10514340	Cdkn2a
10375903	Cdkn2aipnl
10404578	Cdyl
10561008	Ceacam1
10433885	Cebpd
10430825	Cenpm
10358339	Cfh
10364102	Chchd10
10546346	Chchd4
10503174	Chd7
10503176	Chd7
10503218	Chd7
10524266	Chek2
10540298	Chl1
10537298	Chrm2
10474860	Chst14
10455948	Chsy3
10606083	Cited1
10491313	Cldn11
10470101	Clic3
10417167	Clybl
10545862	Cml3
10545865	Cml3
10545869	Cml3
10395039	Cmpk2
10503902	Cnr1
10356520	Col6a3
10503584	Coq3
10559649	Cox6b2
10460157	Cpt1a
10562989	Cpt1c
10568536	Cpxm2
10493108	Crabp2
10344990	Crispld1

ProbeSetID	Gene_Symbol
10597413	Crtap
10567546	Crym
10497001	Cryz
10366293	Csrp2
10513061	Ctnnal1
10554789	Ctsc
10460468	Ctsf
10494262	Ctsk
10436608	Cxadr
10523120	Cxcl5
10357472	Cxcr4
10472757	Cybrd1
10453057	Cyp1b1
10561153	Cyp2b23
10501754	D3Bwg0562e
10498998	D930015E06Rik
10405693	Dapk1
10359386	Dars2
10553092	Dbp
10604333	Dcaf12l1
10351749	Dcaf8
10499138	Dclk2
10455472	Dcp2
10571752	Dctd
10393926	Dcxr
10384378	Ddc
10419240	Ddhd1
10443319	Def6
10485597	Depdc7
10373542	Dgka
10559312	Dhcr7
10421877	Diap3
10407042	Dimt1
10348096	Dis3l2
10600485	Dkc1
10593668	Dmxl2
10593671	Dmxl2
10477325	Dnmt3b
10364346	Dnmt3l
10421046	Dock5
10422436	Dock9
10483046	Dpp4
10595156	Dppa5a
10452867	Dpy30
10404649	Dsp
10439268	Dtx3l
10389238	Dusp14
10548735	Dusp16
10600205	Dusp9
10475610	Dut
10422321	Dzip1
10464400	E330013P04Rik
10603485	Ebp
10551614	Ech1
10362379	Echdc1
10506767	Echdc2
10557009	Eef2k
10557033	Eef2k
10499545	Efna3
10607848	Egfl6

表 1(2/4)

ProbeSetID	Gene_Symbol
10400304	Egln3
10446777	Ehd3
10516371	Eif2c1
10514352	Elavl2
10358027	Elf3
10485656	Elp4
10590909	Endod1
10455595	Eno1
10473240	Eno1
10510546	Eno1
10377938	Eno3
10368317	Enpp3
10458052	Epb4.1l4a
10407955	Epdr1
10544417	Epha1
10440258	Epha3
10503659	Epha7
10537657	Ephb6
10403558	Ero1lb
10420877	Esco2
10407281	Esm1
10384486	Etaa1
10469581	Etl4
10462822	Exoc6
10467688	Exosc1
10471424	Fam102a
10413282	Fam116a
10420023	Fam158a
10439276	Fam162a
10554156	Fam174b
10595402	Fam46a
10568586	Fam53b
10436442	Fam60a
10549497	Fam60a
10402211	Fbln5
10458999	Fbn2
10390574	Fbxl20
10457077	Fbxo15
10412909	Fdft1
10420730	Fdft1
10434698	Fetub
10438017	Fgd4
10604751	Fgf13
10368782	Fig4
10538547	Fkbp9
10472097	Fmnl2
10359571	Fmo1
10349947	Fmod
10447649	Fndc1
10606333	Fndc3c1
10406845	Foxd1
10368886	Foxo3
10368888	Foxo3
10601091	Foxo4
10523376	Fras1
10514088	Frem1
10505568	Frmd3
10486875	Frmd5
10530592	Fryl
10530612	Fryl

ProbeSetID	Gene_Symbol
10579925	Gab1
10385297	Gabra1
10375245	Gabrb2
10375259	Gabrb2
10375261	Gabrb2
10576417	Galnt2
10577164	Gas6
10487011	Gatm
10526055	Gbas
10436500	Gbe1
10419288	Gch1
10594758	Gcnt3
10466659	Gda
10547633	Gdf3
10416340	Gfra2
10503508	Ggh
10503523	Ggh
10516484	Gjb3
10591884	Glil1l2
10446334	Glcci1
10374453	Glul
10426894	Gm10035
10597969	Gm10052
10353252	Gm106
10435961	Gm10808
10490854	Gm13051
10510167	Gm13051
10490294	Gm14326
10479221	Gm14403
10595630	Gm2382
10354768	Gm6644
10385236	Gm6644
10399457	Gm6644
10442027	Gm9943
10461856	Gna14
10365601	Gnptab
10498775	Golim4
10494288	Golph3l
10507299	Gppb1l1
10396740	Gphn
10483679	Gpr155
10600024	Gpr50
10412207	Gpx8
10560945	Grik5
10577114	Grtp1
10537712	Gstk1
10369993	Gstt3
10498935	Gucy1b3
10496379	H2afz
10540999	H2afz
10418747	Hac1l
10502205	Hadh
10375051	Hba-a1
10375058	Hba-a2
10566272	Hbb-y
10407337	Hcn1
10603387	Hdac6
10399973	Hdac9
10435266	Heg1
10435271	Heg1

ProbeSetID	Gene_Symbol
10538658	Herc3
10356593	Hes6
10411373	Hexb
10408227	Hfe
10579894	Hhip
10557519	Hirip3
10404059	Hist1h1c
10408113	Hist1h4i
10491014	Hltf
10510172	Hmgb2
10518350	Hmgb2
10518352	Hmgb2
10571870	Hmgb2
10352954	Hmgb3
10600017	Hmgb3
10494643	Hmgcs2
10595371	Hmgn3
10606436	Hmgn5
10427310	Hnrmpa1
10531633	Hnrnpd
10565156	Homer2
10571840	Hpgd
10531737	Hpse
10345442	Hs6st1
10604542	Hs6st2
10396652	Hspa2
10533050	Hspb8
10384322	Hus1
10543120	Ica1
10355214	Idh1
10558769	Ifitm1
10570434	Ifitm1
10384223	Igfbp3
10469816	Il1rn
10427628	Il7r
10589041	Impdh2
10507286	Ipp
10411235	Iqgap2
10372781	Irak3
10572432	Isyna1
10382713	Itgb4
10435305	Itgb5
10403229	Itgb8
10417212	Itgbl1
10469151	Itih5
10606369	Itm2a
10402283	Itpk1
10404848	Jarid2
10544148	Jhdm1d
10544150	Jhdm1d
10442904	Jmjd8
10445909	Kat2b
10570516	Kbtbd11
10416653	Kbtbd7
10529937	Kcnp4
10545308	Kdm3a
10520612	Khk
10408975	Kif13a
10488156	Kif16b
10431659	Kif21a

ProbeSetID	Gene_Symbol
10602704	Klf8
10542836	Klhdc5
10603896	Klhl13
10434302	Klhl24
10552546	Klk1
10506110	L1td1
10446473	Lama1
10362538	Lama4
10423593	Laptm4b
10508663	Laptm5
10478048	Lbp
10551638	Lgals7
10474419	Lgr4
10558265	Lhpp
10422822	Lifr
10442069	Lix1
10399478	Lpin1
10572130	Lpl
10400126	Lrrm3
10369752	Lrrtm3
10540118	Lsm3
10365983	Lum
10476582	MacroD2
10487441	Mal
10456296	Malt1
10381776	Mapt
10368675	Marcks
10604528	Mbnl3
10394990	Mboat2
10380321	Mbtd1
10497773	Mccc1
10534974	Mcm7
10406334	Mctp1
10564539	Mctp2
10384603	Mdh1
10459730	Me2
10406434	Mef2c
10513869	Megf9
10486041	Meis2
10395409	Meox2
10536505	Met
10426891	Mettl7a1
10354506	Mfsd6
10542470	Mgst1
10602068	Mid2
10370021	Mif
10561806	Mif
10590972	Mif
10544186	Mkrn1
10514255	MLlt3
10492355	Mme
10503448	Mmp16
10389177	Mmp28
10436057	Morc1
10474361	Mpped2
10595979	Mras
10595981	Mras
10436941	Mrps6
10353213	Msc
10447395	Msh2

表 1(3/4)

ProbeSetID	Gene_Symbol
10389680	Msi2
10469559	Msrb2
10574027	Mt1
10587695	Mthfs
10407709	Mtr
10529375	Mxd4
10368199	Myb
10478355	Mybl2
10422075	Mycbp2
10452639	Myl12b
10587446	Myo6
10395259	Nampt
10541524	Nanog
10545041	Nap1l5
10429641	Naprt1
10552697	Napsa
10521168	Nat8l
10381419	Nbr1
10419578	Ndrg2
10501924	Ndst3
10366951	Ndufa4l2
10511665	Necab1
10383897	Nf2
10506050	Nfia
10361869	Nhsl1
10361882	Nhsl1
10373950	Nipsnap1
10601152	Nlgn3
10442643	Nme3
10482517	Nmi
10541845	Nop2
10600707	Nr0b1(Dax1)
10410766	Nr2f1
10469936	Nrarp
10395553	Nrcam
10587639	Nt5e
10402835	Nudt14
10395198	NULL
10417599	NULL
10421524	NULL
10436826	NULL
10457203	NULL
10476658	NULL
10502949	NULL
10559818	NULL
10568731	NULL
10579823	NULL
10582845	NULL
10587688	NULL
10595620	NULL
10595622	NULL
10595626	NULL
10595636	NULL
10598023	NULL
10598062	NULL
10598794	NULL
10546294	Nup210
10554969	Odz4
10433197	Olfrl161
10605884	Ophn1

ProbeSetID	Gene_Symbol
10429859	Oplah
10413826	Oxnad1
10492330	P2ry1
10464949	Pacs1
10454831	Paip2
10602198	Pak3
10523190	Parm1
10352242	Parp1
10544133	Parp12
10363455	Pcbd1
10491885	Pcdh10
10521972	Pcdh7
10421932	Pcdh9
10479726	Pcmt2
10598493	Pcsk1n
10460400	Pcx
10463997	Pdcd4
10484283	Pde1a
10495794	Pde5a
10554521	Pde8a
10443786	Pde9a
10571467	Pdgfrl
10472846	Pdk1
10408656	Peci
10511363	Penk
10361887	Perp
10357535	Pfkfb2
10370376	Pfkl
10354649	Pgap1
10423556	Pgcp
10555303	Pgm2l1
10367945	Phactr2
10599612	Phf6
10602925	Phka2
10573637	Phkb
10603109	Piga
10598467	Pim2
10517600	Pink1
10466779	Pip5k1b
10388718	Pipox
10603087	Pir
10358124	Pkp1
10472212	Pkp4
10476401	Plcb1
10462922	Plce1
10498448	Plch1
10346330	Plcl1
10396800	Plekhh1
10476819	Plk1s1
10580765	Plip
10601888	Plp1
10356082	Plscr1
10489569	Pltp
10430794	Pmm1
10354542	Pms1
10464328	Pnliprp2
10511935	Pnrc1
10517421	Pnrc2
10543791	Podxl
10504518	Polr1e

ProbeSetID	Gene_Symbol
10500362	Polr3gl
10444853	Pou5f1
10407211	Ppap2a
10370552	Ppap2c
10530806	Ppat
10545001	Ppm1k
10458589	Prelid2
10357870	Prelp
10436456	Pros1
10602062	Prps1
10495854	Prss12
10587616	Prss35
10514158	Psip1
10420030	Psme2
10500666	Ptgrn
10543959	Ptn
10424607	Ptp4a3
10357986	Ptprv
10395103	Pxdn
10529895	Qdpr
10468795	Rab11fip2
10587023	Rab27a
10591643	Rab3d
10349724	Rab7l1
10423068	Rad1
10359201	Ralgs2
10374197	Ramp3
10500683	Rangrf
10386455	Rasd1
10421526	Rb1
10573867	Rbl2
10479041	Rbm38
10579830	Rbmxt
10588037	Rbp1
10344952	Rdh10
10354085	Rev1
10438690	Rfc4
10586920	Rfx7
10397030	Rgs6
10472058	Rif1
10606941	Ripply1
10545298	Rmnd5a
10419563	Rnase1
10381416	Rnd2
10478875	Rnf114
10571214	Rnf122
10454198	Rnf125
10377927	Rnf167
10440344	Robo2
10368730	Rpf2
10585703	Rpp25
10479749	Rpp38
10482766	Rprm
10606445	Rps6ka6
10602692	Rragb
10428388	Rspo2
10368495	Rspo3
10493798	S100a16
10563597	Saa3
10428594	Samd12

ProbeSetID	Gene_Symbol
10367772	Samd5
10578763	Sap30
10354777	Satb2
10416023	Scara5
10485955	Scg5
10514956	Scp2
10544875	Scrn1
10443276	Scube3
10596680	Sema3b
10519886	Sema3c
10422598	Sepp1
10406598	Serinc5
10398075	Serpina3n
10408557	Serpinb1a
10355984	Serpine2
10484463	Serping1
10583242	Sesn3
10570957	Sfrp1
10403834	Sfrp4
10359713	Sft2d2
10492864	Sh3d19
10455299	Sh3rf2
10386604	Shmt1
10523260	Shroom3
10569024	Sigirr
10476021	Sirpa
10416887	Slain1
10435251	Slc12a8
10383502	Slc16a3
10408616	Slc22a23
10447773	Slc22a3
10525086	Slc24a6
10452257	Slc25a23
10499766	Slc27a3
10362104	Slc2a12
10547641	Slc2a3
10585381	Slc35f2
10431915	Slc38a4
10598507	Slc38a5
10353117	Slco5a1
10521759	Slit2
10462237	Smarca2
10516956	Smpdl3b
10604844	Sms
10607524	Sms
10461152	Snhg1
10564211	Snrpn
10538290	Snx10
10501762	Snx7
10393449	Socs3
10441815	Sod2
10571567	Sorbs2
10495285	Sort1
10395389	Sostdc1
10491477	Sox2
10422272	Sox21
10531931	Sparcl1
10605792	Spin4
10561712	Spint2
10568174	Spn

表 1(4/4)

ProbeSetID	Gene_Symbol
10363415	Spock2
10453399	Srbd1
10410452	Srd5a1
10369615	Srgn
10542740	Sspn
10592001	St14
10539080	St3gal5
10471457	St6galnac4
10519497	Steap4
10449527	Stk38
10489759	Sulf2
10549700	Suv420h2
10411274	Sv2c
10405216	Sykb
10396485	Syne2
10396511	Syne2
10396606	Syne2
10396608	Syne2
10372324	Syt1
10394942	Taf1b
10439695	Tagln3
10553935	Tarsl2
10438672	Tbccd1
10349295	Tcfcp2l1
10597268	Tdgf1
10420780	Tdh
10474520	Tdh
10505954	Tek
10507347	Tesk2
10369688	Tet1
10369690	Tet1
10369702	Tet1
10502284	Tet2
10447521	Tfb1m
10588007	Tfdp2
10361760	Timm8a1
10606689	Timm8a1
10492428	Tiparp
10466374	Tle4
10553956	Tm2d3
10465342	Tm7sf2
10532157	Tmed5
10404763	Tmem170b
10463632	Tmem180
10462918	Tmem20
10363161	Tmem229b
10401160	Tmem229b
10601701	Tmem35
10503410	Tmem64
10445241	Tnfrsf21
10446229	Tnfsf9
10380381	Tob1
10580522	Tox3
10546417	Trh
10415784	Trim13
10474064	Trp53i11
10428534	Trps1
10397606	Tshr
10400023	Tspan13
10419073	Tspan14

ProbeSetID	Gene_Symbol
10598626	Tspan7
10430319	Tst
10554081	Ttc23
10396952	Ttc9
10549594	Ttyh1
10419170	Txndc16
10494428	Txnip
10502973	Tyw3
10422348	Ugg2
10439130	Umps
10374236	Upp1
10506118	Usp1
10558580	Utf1
10371676	Utp20
10351119	Vamp4
10410931	Vcan
10466441	Vps13a
10399407	Vsnl1
10362717	Wasf1
10475362	Wdr76
10536658	Wnt16
10543253	Wnt2
10347232	Xrcc5
10557481	Ypel3
10584057	Zbtb44
10584067	Zbtb44
10606235	Zdhhc15
10549842	Zfp667
10497222	Zfp704
10449971	Zfp763
10599812	Zic3
10376241	Zic5
10567725	Zkscan2

表 2

ProbeSetID	Gene_Symbol	WT_1	Hetero_1	Homo_1	WT_2	Hetero_2	Homo_2	Homo_WT	Gene_Description
10406845	Foxd1	1907.162	1013.664	189.0742	1169.135	2073.64	213.0658	0.1307221	forkhead box D1
10600707	Nr0b1 (Dax1)	600.2508	463.3753	213.9436	297.1467	500.722	84.39964	0.3324538	nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1
10455967	2610318N02Rik	299.0129	242.182	175.511	284.8518	333.6637	133.7628	0.5297011	RIKEN cDNA 2610318N02 gene
10601888	Plp1	548.1876	520.9453	346.8578	532.7648	555.3928	249.0013	0.5512353	proteolipid protein (myelin) 1
10597268	TdGF1	363.3391	188.9307	191.5322	496.5347	48.17817	46.37038	0.5760708	teratocarcinoma-derived growth factor 1
10427628	Il7r	172.6353	157.2775	110.4006	187.794	186.3655	122.5616	0.6463463	interleukin 7 receptor
10546417	Trh	5151.86	5164.56	3964.438	4078.512	3799.612	2066.166	0.6533435	thyrotropin releasing hormone
10384378	Ddc	532.8297	651.4963	439.7487	514.3596	396.7362	252.7944	0.6613352	dopa decarboxylase
10383502	Slc16a3	173.5407	93.68139	86.64027	103.271	128.3904	98.14812	0.6675597	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 3
10508663	Laptm5	1296.002	1341.368	928.1818	934.4975	765.0215	581.9202	0.6770243	lysosomal-associated protein transmembrane 5
10444853	Pou5f1 (Oct4)	580.3326	331.0451	347.8093	137.8399	297.7903	144.9086	0.6860717	POU domain, class 5, transcription factor 1
10434689	Ahsg	518.3043	459.469	351.82	340.6589	345.8184	237.9795	0.6866412	alpha-2-HS-glycoprotein
10571567	Sorbs2	72.22199	107.8119	68.47545	142.8085	98.51321	81.92367	0.6994317	sorbin and SH3 domain containing 2
10474520	Tdh	1806.862	1653.52	1456.667	975.5377	1095.229	495.9528	0.7017755	L-threonine dehydrogenase
10541524	Nanog	879.9818	581.1512	548.9318	607.2809	817.3279	499.3938	0.7048692	NULL
10607848	Egfl6	319.3753	317.2347	221.9932	615.0161	759.9341	439.9908	0.7084655	EGF-like-domain, multiple 6
10543120	Ica1	199.2784	223.6499	159.1877	219.4949	169.7955	142.1328	0.7195313	islet cell autoantigen 1
10433197	Olfrl161	331.6887	189.4412	222.198	43.61079	54.17622	52.12283	0.7309386	olfactory receptor 161
10519555	Abcb1b	95.26863	134.7628	88.3751	127.8371	90.66637	75.9566	0.7365643	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1B
10600024	Gpr50	406.5322	520.7448	352.0696	293.9517	235.3494	164.1907	0.7370051	G-protein-coupled receptor 50
10405216	Sykb	269.1958	240.6848	212.6284	262.9677	295.1524	183.6975	0.7447444	spleen tyrosine kinase
10368317	Enpp3	1695.622	1632.625	1396.085	1479.3	1630.729	975.4279	0.7469515	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3
10511665	Necab1	798.1784	732.8232	623.2052	266.5315	315.0002	184.0211	0.7581655	N-terminal EF-hand calcium binding protein 1
10434698	Fetub	1292.641	1297.233	1014.081	1013.293	1045.014	738.9089	0.7602085	fetuin beta
10420780	Tdh	1295.836	1179.753	1142.173	822.6995	937.2375	471.2963	0.7615966	L-threonine dehydrogenase
10485597	Depdc7	116.3845	113.1622	90.43533	119.0511	104.3751	91.7043	0.7736284	DEP domain containing 7
10358457	Bex4	77.40945	68.08067	58.00785	89.51287	85.03033	71.9086	0.7783049	brain expressed gene 4
10374453	Glul	1748.494	1599.963	1415.318	1712.382	1753.75	1297.797	0.7839388	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase)
10601701	Tmem35	436.7484	600.8234	452.939	489.5663	357.7737	274.3655	0.7851591	transmembrane protein 35
10558773	B4galnt4	117.3083	100.2108	86.04721	92.27478	99.276	78.73524	0.7862393	beta-1,4-N-acetyl-galactosaminyl transferase 4
10355984	Serpine2	1001.138	981.9673	959.2825	2291.384	2206.508	1636.047	0.7882498	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade E, member 2
10549497	Fam60a	1008.802	949.9811	811.1994	807.5749	869.9814	624.6141	0.7904821	family with sequence similarity 60, member A
10545041	Nap115	98.71779	115.4328	100.4852	155.8871	92.13356	100.8321	0.790705	nucleosome assembly protein 1-like 5
10604751	Fgf13	92.77216	124.6926	95.85143	133.4193	80.94413	83.84093	0.7944258	fibroblast growth factor 13
10506110	L1td1	1031.631	953.7728	874.6639	951.9483	1006.049	703.3372	0.795532	LINE-1 type transposase domain containing 1
10375261	Gabbr2	32.8408	34.07801	33.02683	49.8937	40.26464	32.84089	0.7961337	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, subunit beta 2
10598626	Tspan7	1198.405	1116.596	947.6841	977.4138	922.3863	788.3327	0.7978685	tetraspanin 7
10603896	Klhl13	649.3826	548.8644	521.3143	881.5967	997.8226	702.2975	0.7992347	kelch-like 13 (Drosophila)

考察

本研究では、リプログラミングの新規の制御因子としてFoxo1とFoxd1を見出した。Foxo1とFoxd1の発現抑制によりリプログラミング効率が減少し、またFoxd1についてはホモノックアウトMEF、ヘテロノックアウトMEF、ワイルドタイプMEFと3種類のMEFからリプログラミング効率を比較し、Foxd1の発現量に応じてリプログラミング効率が増加することを示した(図6・図7)。Foxd1はリプログラミングに関与するという報告がなく、また発生の研究においても報告の少ない転写因子である。従来のリプログラミングに関与する遺伝子の同定は、ES細胞やiPS細胞で高発現している遺伝子、増殖や細胞死など細胞において特定の役割を持っている遺伝子を中心に行われてきた^{65,66}。Foxd1はES細胞など多能性幹細胞では発現していないことから、本研究で行ったプロモーター解析のようなin silicoの解析により新規の制御因子を見出したことの意義は大きい。

Foxd1はリプログラミング過程で一過的に発現が上昇するという特徴的な挙動を示している(図12)。また、MEFに比べてリプログラミングが進んだ細胞で発現するが、iPS細胞では発現しない(図12・図13)。Foxd1の挙動は、リプログラミングが少なくとも3つの細胞状態、すなわち2回の細胞状態の変移を含んでいることを意味する。また、Foxd1の発現経路と未分化マーカーであるSSEA1の発現との相関は小さなものであった(図17)。この結果は、共にリプログラミングの進行を示すFoxd1とSSEA1であるが、そのタイミングは互いに依存していないことを意味する。すなわち、リプログラミングの経路が1通りでないことを示唆する結果である。また、Foxd1発現細胞の運命追跡実験から、Nanogを発現するiPS細胞コロニーの95パーセント以上がNanog発現までにFoxd1の発現を経験しており、多くの細胞がリプログラミング過程でFoxd1発現状態を経るということが明らかになった(図16)。

また、本研究では、Foxd1ホモノックアウトiPS細胞とワイルドタイプiPS細胞を、外来遺伝子のサイレンシング、内在性の多能性マーカーの発現、多能性マーカーのプロモーター領域のDNAメチル化、in vitro/in vivo分化誘導系における三胚葉系への分化、そしてキメラマウスの作製により比較した(図18-23)。しかし、その比較において、Foxd1ホモノックアウトiPS細胞とワイルドタイプiPS細胞の間に有意な差を見出すことはできなかった。おそらく多能性の維持や初期発生ではFoxd1は重要な働きはしていないものと考えられる。それはiPS細胞やES細胞でのFoxd1の発現が小さいことから伺える。ただし、Foxd1ホモノックアウトマウスが胎生致死であるように、Foxd1は発生のある時期においては非常に重要な働きを持っているものと考えられる。分化誘導の実験にお

いて差が見られなかったのは、Foxd1が重要な働きを持つであろう発生後半のステージまで細胞状態として至っていないということが考えられる。

最後に、Foxd1の発現が意味するについて整理しておきたい。Foxd1の発現の意味は、Foxd1が持っている2つの役割(リプログラミングの制御因子とリプログラミングマーカー)を別々に考えると分かりやすい。リプログラミングの制御因子としてのFoxd1の意味は、その下流となる遺伝子の発現を制御しリプログラミングに寄与することである。Dax1やEpcamはあくまで候補であるが、Foxd1はリプログラミングに寄与する遺伝子の発現制御によりリプログラミングに寄与することができると考えられる(図7・図9)。しかし、Foxd1自体は必須ではない(図7)。他の転写因子がリダンダントに働いている可能性もあるが、Foxd1がリプログラミングにとって欠かすことのできない構成要素ではなく、リプログラミングに「影響を与える」ことのできる転写因子であるという可能性も十分にあると思っている。

マーカーとしてのFoxd1の性質は、レポーター細胞の実験よりリプログラミングがより進んだ細胞に発現するということが分かっている(図13)。リプログラミングにおけるFoxd1発現細胞の状態について考えたとき、リプログラミング過程において他の腎臓発生のマーカー遺伝子発現が上昇していないことから、腎臓様の細胞ではないと考えられる。Foxd1は腎臓の間質に発現している^{44,45}。間質とはすなわちMEFと同じ間葉系の細胞ということである。MEFからのリプログラミングでMEFと同じ間葉系の細胞のマーカーであるFoxd1が発現するということである。本研究では行っていないが、異なる胚葉由来の細胞におけるリプログラミングにおいてFoxd1の発現が上昇するのか否かは非常に興味深い。また細胞運命追跡実験では、Foxd1の発現を経験することなくリプログラミングされたiPS細胞も検出された。MEFは様々な異なった由来を持つ細胞の集まりであるため、MEFの中でも由来の違いによりFoxd1の発現をしにくい細胞が存在することも考えられる。

本研究で明らかにできたことは、Foxd1とリプログラミングの関わりの中で部分的なものである。しかしながら、Foxd1はリプログラミングのメカニズムについて探るための有用なマーカーとなり、リプログラミングにおける細胞状態の変移を考える大きな手掛かりとなる可能性を持つものである。これからの研究において、Foxd1がリプログラミング研究の進展に少しでも役に立つことがあればうれしい。

材料と方法

プラスミド

レトロウィルスベクターである pMXs ベクターのうち、pMXs-hOct4、pMXs-hSox2、pMXs- hKlf4、pMXs -hcMyc、pMXs- GFP は、米国非営利団体 Addgene^{2,67}、Cell Biolabs より購入した。pMXs-mCherry と pMXs-mFoxd1 は、クローニングを行った mCherry と mFoxd1 をそれぞれ制限酵素により pMXs ベクターに挿入したものである。Foxo1、Foxd1、Dax1 に対する shRNA オリゴ DNA は invitrogen、gleiner より購入した。オリゴ DNA はアニーリングの後 pENTR-H1 ベクター(理研 BRC・三好先生より提供を受けた)に挿入した。H1-shRNA は gateway システム(invitrogen) により pLenti ウィルスベクターに挿入し、これを実験で用いた。

なお、shRNA ターゲット配列は以下のとおりである。

Control, 5' -GGCAATTACAAAATTTGATCA-3' ;
Foxo1_#1, 5' -GCAGCCAGGCATCTCATAACA-3' ;
Foxo1_#2, 5' -GCATGTTTATTGAGCGCTTGG-3' ;
Foxd1_#1, 5' -GAGATCTGCGAGTTCATCAGC-3' ;
Foxd1_#2, 5' -GCGAGATCTGCGAGTTCATCA-3' ;
Dax1_#1, 5' -GCAGTGCGTGAAATACATTGA-3' ;
Dax1_#2, 5' -GCAGATCCTTACTGAGCACAT-3' .

細胞培養

マウス胚性線維芽細胞(以下、MEF とする)、HEK293T 細胞(Invitrogen)、SNL76/7 細胞(ECACC)は、FBS 培地(high-glucose DMEM[ナカライテスク]、10% fetal bovine serum[ニチレイバイオサイエンス]、Glutamax[Gibco]、penicillin/streptomycin[ナカライテスク]含む)で培養した。Plat-E 細胞(Cell Biolabs)は、上記 FBS 培地に puromycine、Blasticidin S を加えた条件で培養した。iPS 細胞(iPS-MEF-Ng-20D-17⁴、文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して理化学研究所 BRC より提供を受けた)、ES 細胞(CGR8)、リプログラミング段階でソートされた細胞は、ES 培地(high-glucose DMEM、15% fetal bovine serum[Hyclone]、nonessential amino acid[Chemicon]、nucleosides[Chemicon]、sodium pyruvate[Invitrogen]、Glutamax、penicillin/streptomycin、2-mercaptoethanol[Gibco]、leukemia inhibitory factor[Millipore]含む)を用い、フィーダー細胞(マイトマイシン C[協和発酵]処理された

SNL76/7 細胞)上で培養した。リプログラミング誘導時の MEF はレトロウィルス含む FBS 培地で 24 時間培養後)KSR 培地(ES 培地の fetal bovine serum を knock out serum replacement[Invitrogen]に置換したもの)を用いて培養した。

マウス・MEF

MEF は交配後 13.5-14.5 日の ICR マウスより胎児を単離し採取したものである。shRNA による発現抑制実験で用いた MEF は、ICR マウスと Nanog-GFP-IRES-PuroR マウス⁴ (文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して理研 BRC より提供を受けた) を掛け合わせたマウスより交配後 13.5 日の胎児を単離し採取した。Foxd1 のノックアウト実験で用いた MEF は、Foxd1-GFP-Cre ノックアウトマウス⁴⁰ のヘテロノックアウトマウスを掛け合わせたマウスより交配後 13.5 日の胎児を単離し採取した。なお、Foxd1 レポーター実験で用いた MEF は、Foxd1-Cre-EGFP のヘテロノックアウト MEF である。細胞運命追跡実験で用いた MEF は、Foxd1-GFP-Cre マウスと CAG-loxp-EGFP マウス⁶² (大阪大学宮崎教授より提供を受けた) を掛け合わせたマウスより交配後 13.5 日の胎児を単離し採取した。なお、MEF は胎児より採取後 3 から 4 回の継代を経てリプログラミング誘導を行った。

リプログラミングの誘導

MEF から iPS 細胞への誘導は、これまでの報告⁶⁴ に準じて行われた。Plat-E 細胞により 4 因子、GFP、mCherry を発現させるレトロウィルスを作製し MEF に感染させ、このときを Day 0 とした。24 時間後(Day 1 において)培地を KSR 培地に置換し、さらに 24 時間後(Day 2)ゼラチンコートをしたプレートに継代を行った。Day 3 以降毎日培地交換を行い観察を行った。shRNA による発現抑制実験では、HEK293T 細胞により shRNA を発現させるレンチウィルスを invitrogen のプロトコルに従って作製し、MEF に感染させた。レンチウィルス感染後 3 日の MEF にレトロウィルスを感染させ、リプログラミングを誘導した。

アルカリフォスファターゼ染色

アルカリフォスファターゼ染色は、Leukocyte Alkaline Phosphatase Kit (Sigma)を用い、「ヒト多能性幹細胞の維持培養プロトコル」(理研 CDB 幹細胞研究支援・開発室)に従って行った。染色後、ArrayScan VTI (Thermo Fisher Scientific)を用いて撮影を行い、コロニー数を計測した。なお、図 6B に示される画像はデジタルカメラで撮影されたも

のである。

免疫組織染色・BrdU 抗体染色

細胞を 3.7%ホルムアルデヒド含む PBS で固定し、0.5%tritonX-100 含む PBS で膜透過処理を行った。5%BSA 含む PBS でブロッキングを行った後、一次抗体液(抗体と 0.5%BSA 含む PBS)に置換した。リプログラミング効率の評価のための Nanog 抗体染色では、一次抗体として Anti-Nanog Rabbit 抗体(Calbiochem、sc1000)、二次抗体として Alexa Fluor 594-conjugated anti-rabbit 抗体(Invitrogen)を用いた。胚葉体形成における分化の評価の際は、一次抗体として Anti-Afp Rabbit 抗体(Dako、A000829)、Anti-Hnf3 β /FoxA2 Goat 抗体(R&D、AF2400)、Anti- α -Sarcomeric actin Mouse 抗体(Sigma、A7811)、Anti-GATA4 Rabbit 抗体(Santa cruz、SC-9053)、Anti-Tuj1 Mouse 抗体(Sigma、T8660)、Anti-Gfap Rabbit 抗体(Dako、Z0334)、二次抗体として Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit 抗体(Invitrogen)、Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse 抗体(Invitrogen)、Alexa Fluor 488-conjugated anti-goat 抗体(Invitrogen)を用いた。

BrdU 抗体染色では、細胞を濃度 20 μ M BrdU 含む培地で 37 度 12 時間インキュベーションした後、3.7%ホルムアルデヒド含む PBS で固定し、0.2%tritonX-100 含む PBS で膜透過処理を行った。次いで、Anti-BrdU 抗体(BD、347580)と DNaseI(タカラバイオ)含む PBS で 37 度 1 時間インキュベーションを行った後、Alexa Fluor 594-conjugated anti-rabbit 抗体と Hoechst と反応させた。染色後、Axio Observer A1(Carl Zeiss)、IX73(Olympus)を用いて撮影を行った。

ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロッティングは、標準的なプロトコルに従って行った。抗体は、Anti-Nanog Rabbit 抗体(Calbiochem、sc1000)、Anti-Oct4 Mouse 抗体(Santa cruz、sc-5279)、Anti-E-cadherin Rabbit 抗体(Cell signaling、24E10)、Anti-Foxo1 Rabbit antibody (Cell Signaling、C29H4)、Anti-tubulin Rabbit 抗体(Sigma、DM1A)を用いた。

FACS 解析

細胞を Fixation Buffer(BD Cytofix)で固定し、Perm/Wash Buffer(BD Cytofix)で膜透過処理を行った後、抗体液に置換し 4 度で 1 時間反応させた。抗体は、Alexa Fluor 647-conjugated anti-Nanog 抗体(BD、560279)と PE-conjugated anti-SSEA1 抗体(Santa Cruz、sc21702)を用いた。染色後の細胞液は、FACSCalibur(BD)ないし JSAN(ベイバイ

オサイエンス)を用いて FACS 解析を行った。データ解析は FlowJo を用いて行った。

セルソーティングは、EGFP-Cre による蛍光を指標に、JSAN を用いて行った。

qRT-PCR 解析

細胞からの total RNA の抽出は RNeasy kit(Qiagen)を用いて、逆転写は QuantiTect Reverse Transcription Kit(Qiagen)を用いて行った。PCR 反応は、LightCycler 480 II(Roche)を用いて解析を行った。測定された値は glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(Gapdh)により補正を行った。

なお、プライマー配列は以下のとおりである。

Gapdh, 5' -TGCAGTGGCAAAGTGGAGATT-3' and

5' -CCTTGACTGTGCCGTTGAATT-3' ;

Foxo1, 5' -AAGAGCGTGCCCTACTTCAA-3' and 5' -TGCTGTGAAGGGACAGATTG-3' ;

Foxd1, 5' -TACTCGTACATCGCGCTCAT-3' and 5' -CTGCTGATGAACTCGCAGAT-3' ;

Nanog, 5' -AAGCGGTGGCAGAAAAAC-3' and 5' -GCAATGGATGCTGGGATACT-3' ;

mOct4, 5' -TCTGTTCCCGTCACTGCTC-3' and 5' -ATTTAACCCCAAAGCTCCAG-3' ;

mSox2, 5' -ATGGCCCAGCACTACCAG-3' and 5' -CCTCCCAATTCCCTTGATC-3' ;

mKlf4, 5' -CCACCTTGCCTTACACATGA-3' and 5' -TGGGAAGACAGTGTGAAAGG-3' ;

hOct4, 5' -GCTCCTGAAGCAGAAGAGGA-3' and 5' -AGATGGTCGTTTGGCTGAAT-3' ;

hSox2, 5' -AACCCCAAGATGCACAACTC-3' and 5' -TCTCCGTCTCCGACAAAAGT-3' ;

hKlf4, 5' -GGAGAAGACACTGCGTCAAG-3' and 5' -AGTCGCTTCATGTGGGAGA-3' ;

Gfp, 5' -GACGACGGCAACTACAAGAC-3' and 5' -TCGGCCATGATATAGACGTT-3' ;

Dax1, 5' -TATCTGAAAGGGACCGTGCT-3' and 5' -TCTCCACTGAAGACCCTCAA-3' ;

Epcam, 5' -GGCAACAAGTTGCTCTCTGA-3' and 5' -TTCATCGCCAAGCATTTAGA-3' ;

Necab1, 5' -GGAGAACAGCAGTGTGTGGA-3' and

5' -TGCTTCTTTGGAACGTCTTG-3' ;

Il7r, 5' -TGGAAGTGGATGGAAGTCAA-3' and 5' -ACTCGTAAAAGAGCCCCACA-3' ;

Thy1, 5' -TGGGAGAAGCACGTGTACTTGAT-3' and

5' -GTTGCCACATTAAAGGCAGCTCGT-3' ;

Afp, 5' -TCCAGAAGGAAGAGTGGACAA-3' and

5' -GCAGACTAGGAGAAGAGAAATAGTTGA-3' ;

Gata6, 5' -CCCTCATCAAGCCACAGAA-3' and 5' -GGTTGTGGTGTGACAGTTGG-3' ;

Gata4, 5' -TCTCACTATGGGCACAGCAG-3' and 5' -GCGATGTCTGAGTGACAGGA-3' ;

SM-actin, 5' -CTGACAGAGGCACCACTGAA-3' and
5' -AGAGGCATAGAGGGACAGCA-3' ;
Cdx2, 5' -CAAGGACGTGAGCATGTATCC-3' and
5' -GTAACCACCGTAGTCCGGGTA-3' ;
Nestin, 5' -CCCTGAAGTCGAGGAGCTG -3' and 5' -CTGCTGCACCTCTAAGCGA-3' .

DNA メチル化解析

細胞からのゲノム DNA の単離・バイサルファイト反応は、EZ DNA Methylation-Direct Kit(Zymo Research)を用いて行った。反応産物より Nanog と Oct4 のプロモーター領域を PCR 反応により増幅し、pCRII-TOPO(Invitrogen)を用いて TOPO クローニングを行った。

なお、プライマー配列は以下のとおりである。

Nanog プロモーター 1st, 5' -GGATGTTTTAGATTAGAGGATGTTTTTA-3'
and 5' -ACCAAAAAACCCACACTCATATCAATATA-3' ;
Nanog プロモーター 2nd, 5' -AATGTTTATGGTGGATTTGTAGGT-3'
and 5' -CCCACACTCATATCAATATAATAAC-3' ;
Oct4 プロモーター 1st, 5' -TTGTTTTGTTTTGGTTTTGGATATGGGTTG-3'
and 5' -CCCAATCCCACCCTCTAACCTTAAC-3' ;and
Oct4 プロモーター 2nd, 5' -ATGGGTTGAAATATTGGGTTTATTTA-3'
and 5' -CCACCCTCTAACCTTAACCTCTAAC-3' .

テラトーマ形成

iPS 細胞 4 ライン(Wt#2、Wt#5、Homo#2、Homo#5)について、濃度 1×10^7 個/ml の細胞液(KSR 培地に懸濁させたもの)を調整した。この細胞液 100 μ l に 100 μ l の Matrigel(BD、356234)を加え、計 200 μ l となった混合液を 10 週齢の Balb/c -nu/nu 雌マウスの皮下に注射し、5 週間後にマウスの解剖を行った。取り出されたテラトーマを 4% paraformaldehyde 含む PBS で固定し、パラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色により観察した。なお、パラフィン包埋切片の作製は、京都大学大学院医学研究科附属総合解剖センターに依頼した。

胚様体形成による in vitro 分化誘導

iPS 細胞 4 ライン(Wt#2、Wt#5、Homo#2、Homo#5)について、濃度 7.5×10^3 個/ml

の細胞液(ES 培地に懸濁させたもの)を調整した。この細胞液 100 μ l を超低接着表面 96 well Dish(coster)上で 5 日間培養し胚様体を作製した。胚様体をゼラチンコートをしたプレートに移し、さらに 10 日間培養し分化誘導を行った。免疫組織染色と qRT-PCR 解析により分化マーカーの発現を調べ、分化の程度について評価した。

キメラマウス作製

iPS 細胞 4 ライン(Wt#2、Wt#5、Homo#2、Homo#5：いずれも C57BL/6 マウス由来)を ICR マウスの胚盤胞に注入し、偽妊娠の ICR マウスに移植した。キメラ性は毛色により(C57BL/6 マウス：茶色、ICR マウス：白色)により評価した。なお、キメラマウス作製は、理研 CDB 動物資源開発室に依頼した。

マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析は Duplicate で行った。細胞からの total RNA の抽出は RNeasy kit(Qiagen)を用いて、Total RNA からプローブを作製は Affymetrix 社のプロトコルに従って行い、このプローブを「Mousegene 1.0 ST アレイ」に hybridize させた。プローブセットのシグナル値は、GeneSpring(Agilent)の robust multi-array average (RMA) アルゴリズムを用いて計算した。annotation は na32(mm9)に基づいている。統計学的な処理は、Benjamini and Hochberg false discovery rate (BH-FDR = 0.1)として one-way analysis of variance (ANOVA)により行った。なお、発現量が非常に低いもの(シグナル値が 100 以下のもの)については解析から除外した。以降のデータ解析は SQL server 2008(Microsoft)を用いて行った。マイクロアレイデータは NCBI GEO database に GSE38509、GSE51179 として登録されている。

また、マイクロアレイの結果を基にした 12 時点のクラスタリング解析は Matlab(MathWorks)により行った。

プロモーター解析

MEFに対してDay 8の時点で発現量が2倍以上に増加していた411遺伝子(629プローブセット)について解析を行った。プロモーターの配列情報(転写開始点上流1200塩基対)はDBTSS³⁸より入手した。それぞれのプロモーター領域にTRANSFAC³⁷のマトリクスが存在するかをMATCH³⁶を用いて調べた。カットオフ値はminSUM とした。検定は578のマトリクスのそれぞれに対して、411遺伝子におけるヒットの有無を全13175遺伝子におけるヒットの有無と比較し、Rを用いてフィッシャーの正確確率検定により判定し

た。

Gene ontology解析

「Biological process」、「Cellular component」、「Molecular function」のうち「Biological process」の4154個のGene ontology termについて評価を行った。ホモノックアウトMEF Day 8における発現量がワイルドタイプMEF Day 8の発現量の80パーセント以下となっていた38遺伝子における割合と、全遺伝子における割合を比較し、Rを用いてフィッシャーの正確確率検定により判定した。

引用文献

- 1 Waddington, C. H. The Strategy of the Genes. Allen &Unwin, London. (1957)
- 2 Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676, doi:10.1016/j.cell.2006.07.024 (2006).
- 3 Yamanaka, S. Strategies and new developments in the generation of patient-specific pluripotent stem cells. *Cell stem cell* **1**, 39-49, doi:10.1016/j.stem.2007.05.012 (2007).
- 4 Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313-317, doi:10.1038/nature05934 (2007).
- 5 Sridharan, R. *et al.* Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell* **136**, 364-377, doi:10.1016/j.cell.2009.01.001 (2009).
- 6 Takahashi, K. *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872, doi:10.1016/j.cell.2007.11.019 (2007).
- 7 Maherali, N. *et al.* Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell stem cell* **1**, 55-70, doi:10.1016/j.stem.2007.05.014 (2007).
- 8 Samavarchi-Tehrani, P. *et al.* Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell stem cell* **7**, 64-77, doi:10.1016/j.stem.2010.04.015 (2010).
- 9 Koche, R. P. *et al.* Reprogramming factor expression initiates widespread targeted chromatin remodeling. *Cell stem cell* **8**, 96-105, doi:10.1016/j.stem.2010.12.001 (2011).
- 10 Liang, G., He, J. & Zhang, Y. Kdm2b promotes induced pluripotent stem cell generation by facilitating gene activation early in reprogramming. *Nature cell biology* **14**, 457-466, doi:10.1038/ncb2483 (2012).
- 11 Onder, T. T. *et al.* Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature* **483**, 598-602, doi:10.1038/nature10953 (2012).
- 12 Harding, J. & Mirochnitchenko, O. Preclinical studies for induced pluripotent stem cell-based therapeutics. *The Journal of biological chemistry*, doi:10.1074/jbc.R113.463737 (2013).
- 13 Alipio, Z. *et al.* Reversal of hyperglycemia in diabetic mouse models using induced-pluripotent stem (iPS)-derived pancreatic beta-like cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 13426-13431, doi:10.1073/pnas.1007884107 (2010).
- 14 Egawa, N. *et al.* Drug screening for ALS using patient-specific induced pluripotent stem cells. *Science translational medicine* **4**, 145ra104, doi:10.1126/scitranslmed.3004052 (2012).
- 15 Juopperi, T. A., Song, H. & Ming, G. L. Modeling neurological diseases using patient-derived induced pluripotent stem cells. *Future neurology* **6**, 363-373, doi:10.2217/fnl.11.14 (2011).

- 16 Ming, G. L. *et al.* Cellular reprogramming: recent advances in modeling neurological diseases. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**, 16070-16075, doi:10.1523/JNEUROSCI.4218-11.2011 (2011).
- 17 Kondo, T. *et al.* Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular Abeta and differential drug responsiveness. *Cell stem cell* **12**, 487-496, doi:10.1016/j.stem.2013.01.009 (2013).
- 18 Koyanagi-Aoi, M. *et al.* Differentiation-defective phenotypes revealed by large-scale analyses of human pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 20569-20574, doi:10.1073/pnas.1319061110 (2013).
- 19 Kim, H. S., Kim, J., Jo, Y., Jeon, D. & Cho, Y. S. Direct lineage reprogramming of mouse fibroblasts to functional midbrain dopaminergic neuronal progenitors. *Stem cell research* **12**, 60-68, doi:10.1016/j.scr.2013.09.007 (2013).
- 20 Vierbuchen, T. *et al.* Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* **463**, 1035-1041, doi:10.1038/nature08797 (2010).
- 21 Hanna, J. *et al.* Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* **133**, 250-264, doi:10.1016/j.cell.2008.03.028 (2008).
- 22 Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J. & Melton, D. A. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* **455**, 627-632, doi:10.1038/nature07314 (2008).
- 23 Mikkelsen, T. S. *et al.* Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* **454**, 49-55, doi:10.1038/nature07056 (2008).
- 24 Wernig, M. *et al.* A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nature biotechnology* **26**, 916-924, doi:10.1038/nbt1483 (2008).
- 25 Li, R. *et al.* A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell stem cell* **7**, 51-63, doi:10.1016/j.stem.2010.04.014 (2010).
- 26 Sunadome, K. *et al.* ERK5 regulates muscle cell fusion through Klf transcription factors. *Developmental cell* **20**, 192-205, doi:10.1016/j.devcel.2010.12.005 (2011).
- 27 Cheng, C., Ung, M., Grant, G. D. & Whitfield, M. L. Transcription factor binding profiles reveal cyclic expression of human protein-coding genes and non-coding RNAs. *PLoS computational biology* **9**, e1003132, doi:10.1371/journal.pcbi.1003132 (2013).
- 28 Li, Z., Tuteja, G., Schug, J. & Kaestner, K. H. Foxa1 and Foxa2 are essential for sexual dimorphism in liver cancer. *Cell* **148**, 72-83, doi:10.1016/j.cell.2011.11.026 (2012).
- 29 Villar, D. *et al.* Cooperativity of stress-responsive transcription factors in core hypoxia-inducible factor binding regions. *PLoS one* **7**, e45708, doi:10.1371/journal.pone.0045708 (2012).
- 30 Kim, J. B. *et al.* Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* **136**, 411-419, doi:10.1016/j.cell.2009.01.023 (2009).

- 31 Kim, J. B. *et al.* Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* **454**, 646-650, doi:10.1038/nature07061 (2008).
- 32 Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science (New York, N.Y.)* **322**, 949-953, doi:10.1126/science.1164270 (2008).
- 33 Shi, Y. *et al.* A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* **2**, 525-528, doi:10.1016/j.stem.2008.05.011 (2008).
- 34 Hanna, J. *et al.* Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* **462**, 595-601, doi:10.1038/nature08592 (2009).
- 35 Smith, Z. D., Nachman, I., Regev, A. & Meissner, A. Dynamic single-cell imaging of direct reprogramming reveals an early specifying event. *Nature biotechnology* **28**, 521-526, doi:10.1038/nbt.1632 (2010).
- 36 Kel, A. E. *et al.* MATCH: A tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences. *Nucleic acids research* **31**, 3576-3579 (2003).
- 37 Matys, V. *et al.* TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic acids research* **34**, D108-110, doi:10.1093/nar/gkj143 (2006).
- 38 Suzuki, Y., Yamashita, R., Sugano, S. & Nakai, K. DBTSS, DataBase of Transcriptional Start Sites: progress report 2004. *Nucleic acids research* **32**, D78-81, doi:10.1093/nar/gkh076 (2004).
- 39 Carreres, M. I. *et al.* Transcription factor Foxd1 is required for the specification of the temporal retina in mammals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**, 5673-5681, doi:10.1523/JNEUROSCI.0394-11.2011 (2011).
- 40 Humphreys, B. D. *et al.* Fate tracing reveals the pericyte and not epithelial origin of myofibroblasts in kidney fibrosis. *The American journal of pathology* **176**, 85-97, doi:10.2353/ajpath.2010.090517 (2010).
- 41 Levinson, R. S. *et al.* Foxd1-dependent signals control cellularity in the renal capsule, a structure required for normal renal development. *Development* **132**, 529-539, doi:10.1242/dev.01604 (2005).
- 42 Park, S. J. *et al.* Inferring the choreography of parental genomes during fertilization from ultralarge-scale whole-transcriptome analysis. *Genes & development* **27**, 2736-2748, doi:10.1101/gad.227926.113 (2013).
- 43 Fetting, J. L. *et al.* FOXD1 promotes nephron progenitor differentiation by repressing decorin in the embryonic kidney. *Development* **141**, 17-27, doi:10.1242/dev.089078 (2014).
- 44 Hatini, V., Huh, S. O., Herzlinger, D., Soares, V. C. & Lai, E. Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2. *Genes & development* **10**, 1467-1478 (1996).

- 45 Mugford, J. W., Sipila, P., McMahon, J. A. & McMahon, A. P. Osr1 expression demarcates a multi-potent population of intermediate mesoderm that undergoes progressive restriction to an Osr1-dependent nephron progenitor compartment within the mammalian kidney. *Developmental biology* **324**, 88-98, doi:10.1016/j.ydbio.2008.09.010 (2008).
- 46 Carter, M. E. & Brunet, A. FOXO transcription factors. *Current biology : CB* **17**, R113-114, doi:10.1016/j.cub.2007.01.008 (2007).
- 47 Kloet, D. E. & Burgering, B. M. The PKB/FOXO switch in aging and cancer. *Biochimica et biophysica acta* **1813**, 1926-1937, doi:10.1016/j.bbamcr.2011.04.003 (2011).
- 48 Zhang, X. *et al.* FOXO1 is an essential regulator of pluripotency in human embryonic stem cells. *Nature cell biology* **13**, 1092-1099, doi:10.1038/ncb2293 (2011).
- 49 Yu, Y. *et al.* Stimulation of Somatic Cell Reprogramming by Eras-Akt-Foxo1 Signaling Axis. *Stem cells*, doi:10.1002/stem.1447 (2013).
- 50 Nakagawa, M. *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology* **26**, 101-106, doi:10.1038/nbt1374 (2008).
- 51 Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J. P. & Jaenisch, R. cMyc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell stem cell* **2**, 10-12, doi:10.1016/j.stem.2007.12.001 (2008).
- 52 Benayoun, B. A., Caburet, S. & Veitia, R. A. Forkhead transcription factors: key players in health and disease. *Trends in genetics : TIG* **27**, 224-232, doi:10.1016/j.tig.2011.03.003 (2011).
- 53 Molin, L. *et al.* Evolutionary conservation of redundancy between a diverged pair of forkhead transcription factor homologues. *Development* **127**, 4825-4835 (2000).
- 54 Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J. & Orkin, S. H. An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* **132**, 1049-1061, doi:10.1016/j.cell.2008.02.039 (2008).
- 55 van den Berg, D. L. *et al.* An Oct4-centered protein interaction network in embryonic stem cells. *Cell stem cell* **6**, 369-381, doi:10.1016/j.stem.2010.02.014 (2010).
- 56 Kelly, V. R., Xu, B., Kuick, R., Koenig, R. J. & Hammer, G. D. Dax1 up-regulates Oct4 expression in mouse embryonic stem cells via LRH-1 and SRA. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* **24**, 2281-2291, doi:10.1210/me.2010-0133 (2010).
- 57 Sun, C. *et al.* Dax1 binds to Oct3/4 and inhibits its transcriptional activity in embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology* **29**, 4574-4583, doi:10.1128/mcb.01863-08 (2009).
- 58 Wang, Q. & Cooney, A. J. The role of nuclear receptors in embryonic stem cells. *Advances in experimental medicine and biology* **786**, 287-306, doi:10.1007/978-94-007-6621-1_16 (2013).
- 59 Huang, H. P. *et al.* Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) complex proteins promote transcription factor-mediated pluripotency reprogramming. *The Journal of biological chemistry* **286**, 33520-33532, doi:10.1074/jbc.M111.256164 (2011).

- 60 Lu, T. Y. *et al.* Epithelial cell adhesion molecule regulation is associated with the maintenance of the undifferentiated phenotype of human embryonic stem cells. *The Journal of biological chemistry* **285**, 8719-8732, doi:10.1074/jbc.M109.077081 (2010).
- 61 Kim, J. H. *et al.* Regulation of adipose tissue stromal cells behaviors by endogenic Oct4 expression control. *PloS one* **4**, e7166, doi:10.1371/journal.pone.0007166 (2009).
- 62 Kawamoto, S. *et al.* A novel reporter mouse strain that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated recombination. *FEBS letters* **470**, 263-268 (2000).
- 63 Frommer, M. *et al.* A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 1827-1831 (1992).
- 64 Kawamura, T. *et al.* Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* **460**, 1140-1144, doi:10.1038/nature08311 (2009).
- 65 Tapia, N. & Scholer, H. R. p53 connects tumorigenesis and reprogramming to pluripotency. *The Journal of experimental medicine* **207**, 2045-2048, doi:10.1084/jem.20101866 (2010).
- 66 Li, F. *et al.* Apoptotic caspases regulate induction of iPSCs from human fibroblasts. *Cell stem cell* **7**, 508-520, doi:10.1016/j.stem.2010.09.003 (2010).
- 67 Kitamura, T. *et al.* Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Experimental hematology* **31**, 1007-1014 (2003).

謝辞

修士・博士の 5 年間にわたって研究を指導してくださった戎家美紀博士には、本当に感謝しています。研究者としての土台を築くべきこの時期にともに研究ができたことは、私の人生の中で大きな財産であると思います。そして、同じく 5 年間を通して心優しき素適な先輩として、研究内外に関わらず相談に乗ってくださった松田充弘博士に心よりお礼を申し上げます。そして、常に温かく見守って頂き、そして適切なアドバイスを与えてくださった研究室のボスである西田栄介教授に深く感謝を致します。

また、立命館大学の川村晃久准教授、十河孝浩博士、上辻(重野)麻子さんには、リプログラミングの実験系の樹立やマウスを用いた実験の指導を頂きました。西田研究室の同期であり共にリプログラミング研究に取り組んできた太田翔さん、李俊成さんには、研究の進め方について様々なアドバイスを頂きました。各々お世話になったみなさまに、そして長きにわたって支えてくれた両親・家族に、深謝致します。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Makito Koga, Mitsuhiro Matsuda, Teruhisa Kawamura, Takahiro Sogo, Asako Shigeno, Eisuke Nishida & Miki Ebisuya

Foxd1 is a mediator and indicator of the cell reprogramming process

Nature Communications, 2014 Feb 5;5:3197